

**ÇİPURA (*SPARUS AURATA* L., 1758) BEYİN  
DİBENZİLFLORESEİN *O*-DEBENZİLİZ ENZİMİNİN  
KARAKTERİZE EDİLMESİ**

**Demet HANÇER**

**Ağustos, 2007  
DENİZLİ**

**ÇİPURA (*SPARUS AURATA* L., 1758) BEYİN  
DİBENZİLFLORESEİN *O*-DEBENZİLİZ ENZİMİNİN  
KARAKTERİZE EDİLMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı**

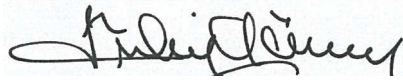
**Demet HANÇER**

**Danışman: Prof. Dr. Alaattin ŞEN**

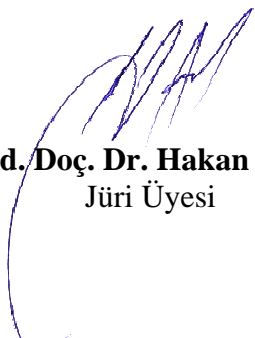
**Ağustos, 2007  
DENİZLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU**

Demet HANÇER tarafından Prof. Dr. Alaattin ŞEN yönetiminde hazırlanan “Çipura (*Sparus aurata* L., 1758) Beyin Dibenzilfloresein *O*-debenzilaz Enziminin Karakterize Edilmesi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



**Prof. Dr. Tülin GÜRAY**  
Jüri Başkanı



**Yrd. Doç. Dr. Hakan AKÇA**  
Jüri Üyesi




**Prof. Dr. Alaattin ŞEN**  
Jüri Üyesi (Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..../..../.....  
Tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Mehmet Ali SARIGÖL**  
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :   
Öğrencinin Adı Soyadı : Demet HANÇER

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma alanına beni yönlendiren, çalışmalarım esnasında hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, her zaman görüşlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e minnettarlığımı belirtir, sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım süresince numune temini için bana yardımcı olan İzmir, Çeşme, Ildır'da bulunan Pınar Balık Ltd.'ye, tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e, Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Adile ÖZDEMİR, Kimya Bölümü Araştırma Görevlisi Abdullah AKDOĞAN ve Hatice Ardağ AKDOĞAN'a ayrıca arkadaşlarım Mehmet ÖZKARSLI, Hatice Kübra AYNACI ve Pelin TEKİN'e göstermiş oldukları fedakârlıklarından dolayı tüm içtenliğimle teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum.

Tüm eğitim hayatımda olduğu gibi yüksek lisans eğitimim esnasında tezimin her aşamasında göstermiş oldukları maddi ve manevi desteklerini, güvenlerini esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

## ÖZET

### ÇİPURA (SPARUS AURATA L., 1758) BEYİN DİBENZİLFLORESEİN O-DEBENZİL AZ ENZİMİNİN KARAKTERİZE EDİLMESİ

HANÇER, Demet  
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji ABD  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Ağustos 2007, 89 Sayfa

Aromataz, sitokrom P450 süper ailesinin üyesi olan CYP19 geni tarafından kodlanmakta ve androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizlemektedir. Doğal aromatazın katalitik aktivitesi ve enzim kinetikleri hakkında bilgi balıklarda çok azdır ve bu tür içi ve türler arasında farklı organlardan elde edilen aromataz aktivitesinin karşılaştırılmasını engellemektedir. Bu çalışmada, floresans aromataz metodu, florometrik bir substrat olan O-benzilfloresein benzil ester (DBF) kullanılarak çipura (*Sparus aurata* L., 1758) beyin ve karaciğer mikrozomlarında DBFOD aktivitesini ölçmek için karakterize edilmiştir. Optimize edilen metot değişkenleri, doku miktarı, pH, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon zamanı ve substrat konsantrasyonunu içermektedir. Beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi 30 dak reaksiyon zamanı boyunca sırasıyla 20 µg ve 40 µg protein miktarına kadar doğrusallık göstermiştir. Beyin ve karaciğerde enzimin optimum pH'sı sırasıyla 6,50 ve 8,25 olarak ve optimum sıcaklığı her iki doku için 30 °C olarak bulunmuştur. Beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesinin 2 µM DBF konsantrasyonu üzerinde doyuma ulaştığı gözlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak yapılan saptamalarda beyin ve karaciğer DBFOD enzimi için  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri belirlendi ve sırasıyla 8,054±0,550 pmol/dak/mg protein, 8,389±0,543 pmol/dak/mg protein ve 0,840±0,161 µM, 0,959±0,152 µM olarak hesaplandı. Testosteronun *Sparus aurata* beyin ve karaciğer DBFOD enzimini yarışmalı bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir. Çeşitli yöresel Türk bitkisel gıdalarının DBFOD aktivitesi üzerine etkileri belirlenmiş ve bulgular bize bu gıdaların yeni aromataz inhibitörleri için potansiyel gıda kaynağı olabileceğini göstermiştir. Western blot analizleri anti-rat aromataz antikoru kullanılarak çalışılmıştır. Çipurada beyin ve karaciğer aromatazı için ilk defa rapor edilmiş bu metodun parametreleri diğer türlerde de aromataz aktivitesini ölçmek için faydalı olabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Aromataz, beyin, çipura, karakterizasyon, dibenzilfloresein.

Prof. Dr. Tülin GÜRAY  
Prof. Dr. Alaattin ŞEN  
Yrd. Doç. Dr. Hakan AKÇA

**ABSTRACT****CHARACTERIZATION OF BRAIN DIBENZYLFLUORESCÉIN O-DIBENZYLASE IN GILTHEAD SEABREAM (*SPARUS AURATA* L., 1758)**

HANCER, Demet  
M. Sc. Thesis in Biology  
Supervisor: Prof. Dr. Alaattin SEN

August 2007, 89 Pages

Aromatase is encoded by the CYP19 gene, a member of the cytochrome P450 superfamily, and catalyzes the conversion of androgens into estrogens. Data on native aromatase enzyme kinetics and thus actual catalytic activity are scarce in fish, impeding comparison of aromatase activity (AA) from different organs within and between species. In the present study, fluorescence aromatase assay was optimized to measure DBFOD activity in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) using O-benzylfluorescein benzyl ester (DBF) as a fluorometric substrate in brain and liver microsomes. Optimized assay variables included amount of tissue, pH, incubation temperature, incubation time and substrate concentration. Brain and liver DBFOD activity have showed linearity until 20 and 40 µg protein concentration throughout 30 minutes, respectively. In brain and liver optimum pH of the enzyme have found to be 6.50 and 8.25, respectively and optimum temperature have found to be 30°C for both tissues. It has been observed that brain and liver enzyme activities have saturated at and above 2 µM DBF concentrations.  $V_{max}$  and  $K_m$  values of brain and liver DBFOD enzyme was determined using Lineweaver-Burk graph, and calculated  $8.054 \pm 0.550$  pmol/min/mg protein,  $8.389 \pm 0.543$  pmol/min/mg protein and  $0.840 \pm 0.161$  µM,  $0.959 \pm 0.152$  µM, respectively. Testosterone appeared to inhibit the *Sparus aurata* brain and liver DBFOD enzyme competitively. The effects of a variety of Turkish traditional dietary plants on DBFOD activity was also determined and these results could lead us to identify the diets that could be potential dietary source for novel aromatase inhibitors. Western blot analysis performed using anti-rat aromatase antibodies. In conclusion, the parameters of this assay that are reported for brain and liver aromatase in gilthead seabream could be useful to measure aromatase activity in other species.

**Keywords:** Aromatase, brain, gilthead seabream, characterization, dibenzylfluorescein.

Prof. Dr. Tülin GÜRAY  
Prof. Dr. Alaattin ŞEN  
Asst. Prof. Dr. Hakan AKÇA

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Yüksek Lisans Tez Onay Sayfası .....	i
Bilimsel Etik .....	ii
Teşekkür.....	iii
Özet .....	iv
Abstract.....	v
İçindekiler Dizini .....	vi
Şekiller Dizini .....	ix
Tablolar Dizini .....	xi
Simge ve Kısaltmalar Dizini .....	xii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Sitokrom P450 Monooksijenaz Sistemleri.....	2
1.1.1. Sitokrom P450'lerin karakteristik ve yapısal özellikleri .....	4
1.1.2. Sitokrom P450'lerin sınıflandırılması ve adlandırılması .....	7
1.2. Balık Sitokrom P450'leri.....	8
1.3. Steroid Hormonlar .....	9
1.4 Östrojenlerin Endokrinolojisi ve Aromatazın Rolü .....	11
1.5 Sitokrom P450 Aromataz (EC 1.14.14.1).....	14
1.6 Çalışmanın Amacı.....	24
<b>2. MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>26</b>
2.1. Materyaller.....	26
2.1.1. Deney hayvanı .....	26
2.1.2. Kullanılan kimyasallar .....	28
2.2. Metotlar.....	29
2.2.1. Canlıların temini .....	29
2.2.2. Mikrozomal fraksiyonların hazırlanması .....	29
2.2.3. Protein miktar tayini .....	30
2.2.4. <i>S. aurata</i> mikrozomal Dibenzilfloresein <i>O</i> -debenzilaz (DBFOD) aktivite tayini .....	30
2.2.5. DBFOD aktivitesinin <i>S. aurata</i> mikrozomlarında karakterizasyonu.....	32
2.2.5.1. DBFOD aktivitesi üzerine protein konsantrasyonu etkisi .....	32
2.2.5.1.1. Beyin DBFOD aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi.....	32
2.2.5.1.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi.....	33
2.2.5.2. DBFOD aktivitesi üzerine pH etkisi.....	33
2.2.5.2.1. Beyin DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi .....	33
2.2.5.2.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi.....	33
2.2.5.3. DBFOD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi.....	33
2.2.5.3.1. Beyin DBFOD aktivitesinin inkübasyon sıcaklığı ile değişimi .....	33



2.2.5.3.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin inkübasyon sıcaklığı ile değişimi.....	33
2.2.5.4. DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi .....	34
2.2.5.4.1. Beyin DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi.....	34
2.2.5.4.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi .....	34
2.2.5.5. DBFOD aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi .....	34
2.2.5.5.1. Beyin DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimi.....	34
2.2.5.5.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimi.....	34
2.2.5.6. <i>Sparus aurata</i> mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine <i>in vitro</i> testosteron etkisi tayini .....	34
2.2.5.6.1. Beyin DBFOD aktivitesi üzerine <i>in vitro</i> testosteron etkisi tayini .....	34
2.2.5.6.2. Karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine <i>in vitro</i> testosteron etkisi tayini .....	35
2.2.6. Mikrodalga ekstraksiyonu.....	35
2.2.7. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAJE) .....	36
2.2.7.1. Stok çözeltiler .....	36
2.2.7.1.1. 10X elektrot tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, pH 8,30) .....	36
2.2.7.1.2. Stok ayrıştırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,80) .....	37
2.2.7.1.3. Stok sıkıştırma jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,80).....	37
2.2.7.1.4. Stok jel çözeltisi (Akrilamid-BIS, %30 T, %2,67 C) .....	37
2.2.7.1.5. %10 SDS .....	37
2.2.7.1.6. %10 Amonyum persülfat .....	37
2.2.7.1.7. 4X numune seyreltme tamponu .....	37
2.2.7.1.8. Stok moleküler ağırlık standart çözeltileri.....	38
2.2.7.1.9. Jel polimerizasyon çözeltilerinin hazırlanması .....	38
2.2.7.2. Prosedür .....	39
2.2.7.2.1. Jelin hazırlanması.....	39
2.2.7.2.2. Örneğin ve moleküler ağırlık standartlarının hazırlanması .....	39
2.2.7.2.3. Örneklerin yüklenmesi.....	40
2.2.7.2.4. Elektroforetik ayrıştırma.....	40
2.2.7.2.5. "iBlot" kuru transfer sistemi .....	40
2.2.7.2.6. Proteinlerin immünokimyasal tespiti .....	41
2.2.8. <i>Sparus aurata</i> beyin dokusundan total RNA izolasyonu.....	42
2.2.9. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) .....	43
2.3. İstatistiksel Analizler .....	44
3. BULGULAR .....	45
3.1. <i>Sparus aurata</i> Mikrozomal Fraksiyonlarında Protein Tayini.....	45
3.2. <i>Sparus aurata</i> Mikrozomal DBFOD Aktivitesinin Tayini .....	45
3.3. DBFOD Aktivitesinin <i>Sparus aurata</i> Mikrozomlarında Karakterizasyonu .....	46
3.3.1. <i>Sparus aurata</i> mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	46
3.3.1.1. Beyin DBFOD aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi .....	46
3.3.1.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi.....	46
3.3.2. <i>Sparus aurata</i> mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine pH etkisinin tayini...47	
3.3.2.1. Beyin DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi .....	47

3.3.2.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi.....	48
3.3.3. <i>Sparus aurata</i> mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi tayini	50
3.3.3.1. Beyin DBFOD aktivitesinin sıcaklık ile değişimi .....	49
3.3.3.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin sıcaklık ile değişimi .....	50
3.3.4. <i>Sparus aurata</i> mikrozomal DBFOD aktivitesinin zamana karşı değişimi ....	51
3.3.4.1. Beyin DBFOD aktivitesinin zamana karşı değişimi.....	51
3.3.4.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin zamana karşı değişimi.....	52
3.3.5. <i>Sparus aurata</i> mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonu etkisinin tayini.....	53
3.3.5.1. Beyin DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimi .....	53
3.3.5.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimi.....	54
3.3.6. <i>Sparus aurata</i> mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine <i>in vitro</i> testosteron etkisi tayini.....	56
3.3.6.1. Beyin DBFOD aktivitesi üzerine <i>in vitro</i> testosteron etkisi tayini .....	56
3.3.6.2. Karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine <i>in vitro</i> testosteron etkisi tayini ..	57
3.4. DBFOD Aktivitesinin <i>Sparus aurata</i> Balığında Doku Dağılımı.....	58
3.5. <i>Sparus aurata</i> Mikrozomal Beyin ve Karaciğer DBFOD Aktivitesi Üzerine Olağan Bitkisel Gıdaların Etkisi .....	58
3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blot Analizleri.....	61
3.7. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	62
4. TARTIŞMA .....	64
5. SONUÇ .....	75
KAYNAKLAR .....	76
ÖZGEÇMİŞ .....	89

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Sitokrom P450 proteinlerinin üç boyutlu yapısı.....	6
Şekil 1.2 Sitokrom P450 enzimlerinin katalitik mekanizması.....	7
Şekil 1.3 Steroid hormonların biyokimyasal sentezleri.....	10
Şekil 1.4 Steroid hormon etkisinin genel mekanizması.....	13
Şekil 1.5 Aromataz tarafından steroid hormon biyosentezi.....	16
Şekil 1.6 İnsan aromataz geni.....	16
Şekil 2.1 <i>Sparus aurata</i> .....	27
Şekil 2.2 DBFOD aktivitesinin DBF kullanılarak tayini.....	31
Şekil 3.1 Floroseinin eksitasyon spektrumu .....	45
Şekil 3.2 Floroseinin emisyon spektrumu .....	45
Şekil 3.3 Protein konsantrasyonunun <i>Sparus aurata</i> mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine etkisi .....	46
Şekil 3.4 Protein konsantrasyonunun <i>Sparus aurata</i> mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkisi .....	47
Şekil 3.5 pH'ın <i>Sparus aurata</i> mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine etkisi ....	48
Şekil 3.6 pH'ın <i>Sparus aurata</i> mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkisi.....	59
Şekil 3.7 Sıcaklığın <i>Sparus aurata</i> mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine etkisi.....	50
Şekil 3.8 Sıcaklığın <i>Sparus aurata</i> mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkisi.....	51
Şekil 3.9 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal beyin DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi...52	52
Şekil 3.10 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi.....	52
Şekil 3.11 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal beyin DBFOD substrat doyum grafiği .....	53
Şekil 3.12 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal beyin DBFOD Lineweaver-Burk substrat doyum grafiği.....	54
Şekil 3.13 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal karaciğer DBFOD substrat doyum grafiği .....	55
Şekil 3.14 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal karaciğer DBFOD Lineweaver-Burk substrat doyum grafiği.....	55
Şekil 3.15 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine testosteron inhibisyonu .....	56
Şekil 3.16 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine testosteron inhibisyonu .....	57
Şekil 3.17 DBFOD aktivitesinin <i>Sparus aurata</i> balığında doku dağılımı.....	58
Şekil 3.18 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine olağan bitkisel gıdaların etkisi.....	59
Şekil 3.19 <i>Sparus aurata</i> mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine olağan bitkisel gıdaların etkisi .....	60

<b>Şekil 3.20</b> <i>Sparus aurata</i> beyin, karaciğer, testis, kalp, böbrek, ince ve kalın bağırsak mikrozomlarının SDS-poliakrilamid jel elektroforezi .....	61
<b>Şekil 3.21</b> <i>Sparus aurata</i> ile rat mikrozomlarında CYP19'un poliklonal anti-Rabbit CYP19 IgG kullanılarak immünoblot analizi .....	62
<b>Şekil 3.22</b> RT-PCR sonucunun agaroz jeldeki görüntüsü .....	63

**TABLULAR DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.1</b> Bazı sitokrom P450 substratları .....	3
<b>Tablo 2.1</b> <i>Sparus aurata</i> 'nın sistematığı .....	26
<b>Tablo 2.2</b> Tipik beyin DBFOD aktivite ölçüm karışımının içeriği .....	31
<b>Tablo 2.3</b> Tipik karaciğer DBFOD aktivite ölçüm karışımının içeriği .....	32
<b>Tablo 2.4</b> 4X numune sulandırma tamponunun içeriği .....	38
<b>Tablo 2.5</b> SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları .....	38
<b>Tablo 2.6</b> Nitroselüloz membran üzerinde transfer edilen proteinlerin immünolojik tayini için substrat çözeltisi hazırlama .....	42
<b>Tablo 2.7</b> RT-PCR karışımının içeriği .....	44
<b>Tablo 4.1</b> <i>S. aurata</i> bireylerinde mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD enziminin karakterizasyonu verileri ve <i>in vitro</i> testosteron inhibisyonu .....	68

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
AA	Aromataz aktivitesi
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
APS	Amonyum persülfat
BCIP	5-Bromo-4-kloro-3-indol fosfat
BHT	Butile hidroksi toluen
BIS	N, N'-metilen bisakrilamid
BSA	Sığır serum albumin
$\text{CaCl}_2$	Kalsiyumklorür
cm	Santimetre
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
CRH	Kortikotropin serbestleştirici hormon
CYP	Sitokrom P450
DBF	Dibenzilfloresein
DBFOD	Dibenzilfloresein <i>O</i> -debenzilaz
DEA	Dietanolamin
dak	Dakika
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Östrojen reseptörü
$\text{ERE}_S$	Östrojen sorumlu elementler
gr	Gram
GSH	Glutatyon
HCl	Hidroklorikasit
$\text{HCOOH}$	Formik asit
HPOA	Hipotalamik preoptik bölge
$\text{HRE}_S$	Hormon sorumlu elementler
<i>ki</i>	Biyomoleküler kararlılık hızı
KPi	Potasyum fosfat
lt	Litre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
3-MC	3-MetilKolantren
M	Molarite
$\text{MgCl}_2$	Magnezyum klorür
MSS	Merkezi sinir sistemi
N	Normalite
NaCl	Sodyum klorür
NADPH	$\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit

NBT	Nitro blue tetrazolium
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
pmol	Pikomol
RT-PCR	Ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAJE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
sn	Saniye
SRY	Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge
TBST	Tris tampon tuzu Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametil etilen diamin
UV	Ultraviyole
U	Ünite
V	Volt
ZnCl <sub>2</sub>	Çinko klorür

## 1. GİRİŞ

Sitokrom P450 (CYP) süper enzim ailesi hem ekzojen ksenobiyotiklerin ve hem de yağ asitleri gibi endojen bileşiklerin metabolizmasında rol oynayan önemli bir enzim grubudur (Nelson vd 1996). Ksenobiyotikler bu enzimler yardımıyla genellikle biyoinaktif forma dönüştürülürken endojen moleküller çeşitli önemli metabolitlere dönüştürülür. Organizmalar için bu bileşiklerin en önemli sorunu vücutta çeşitli toksisiteler oluşturmalarıdır. Bu tür bileşiklerin vücuttan uzaklaştırılmaları için çözünür hale getirilmeleri ve organizma dışına atılmaları gereklidir. Ksenobiyotikler çok lipofiliktir ve çeşitli dokularda birikirler. Bu birikim birçok toksik etkilere neden olur. Vücutta hücre membranlarını, proteinleri ve tüm hayatsal olayları olumsuz olarak etkiler ve tümör oluşumuna kadar çeşitli patofizyolojik olgulara neden olur. Bu durumda testosteron ve laurik asit gibi endojen metabolizmalarda değişimler gözlemlenir (McGiff ve Quilley 1999, Capdevila ve Falck 2001).

Bu endojen metabolizmalarda yer alan CYP izozimlerinden olan aromataz (CYP19), testosteron ve androstendion gibi androjenleri östradiol ve östron gibi östrojenlere dönüştüren ve östrojen biyosentezinden sorumlu olan bir enzim kompleksidir (Simpson vd 1994). İnsanlarda en etkili endojen östrojen olan östradiol düzeyleri dişi üremesi ve yine dişilerde diğer hormonal etkiler için kritiktir. Var olan aromataz miktarındaki değişimler veya enzimin katalitik aktivitesi dokulardaki östrojen düzeylerini değiştirebilmekte ve östrojen hormon faaliyetine çarpıcı bir şekilde engel olabilmektedir. Aromatazın inhibisyonu enzimin katalitik aktivitesini değiştirmekte ve östrojen düzeylerinde hızlı bir azalma ile sonuçlanmaktadır. Enzim inhibisyonunun bu mekanizması, östrojen bağımlı meme kanserinin tedavisinde aromataz inhibitörlerinin terapötik etkisi için bir kanıttır ve östrojen faaliyetinde östrojen düzeylerinin önemini gösterir (Brodie vd 1999, Santen ve Harvey 1999). Aromataz protein düzeylerinin baskılanması dokulardaki östrojenlerin sonraki düzeylerini ve hormon faaliyetini çarpıcı bir şekilde etkileyebilmektedir. Çevresel ajanlar, toksik maddeler ve çeşitli doğal ürünler, aromataz protein düzeylerinde değişim ya da aromataz inhibisyon yolu



ile faaliyet göstererek östrojen düzeylerini değiştirirler ve endokrin engelleyiciler olarak etki ederler (Kuhl vd 2005). Bu çalışmada çipura (*Sparus aurata* L., 1758) beyin ve karaciğer dibenzilfloresein *O*-debenzilaz (DBFOD) aktivitesi yeni bir substrat olan *O*-benzilfloresein benzil ester (dibenzilfloresein) (DBF) kullanılarak karşılaştırmalı olarak karakterize edildi.

### 1.1. Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri

Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemi; steroidler, yağ asitleri, prostaglandinler, lökotrienler ve daha birçok doğal bileşiklerin olduğu kadar karsinogenlerin, mutajenlerin ve ilaçların oksidatif metabolizmasına katılan ‘hemtiyolat’ yapısında protein enzimlerden oluşur. Genellikle, çok bileşkenli elektron transport zincirlerinde terminal oksidaz olarak etki eder ve P450 içeren monooksijenaz sistemleri olarak adlandırılır (Lu ve Lewin 1974, Nebert vd 1987). Bu sistem böbrek, akciğer, deri, bağırsak, adrenal korteks, plasenta ve diğer farklı dokularda bulunur, ama özellikle karaciğerde etkindir. Ayrıca, böcek ilaçları, prokarsinogenler, anestezi malzemeleri, organik çözücüler gibi ksenobiotiklerin metabolizmasında bulunurlar (Nebert ve Gonzales 1987, Zimniak ve Waxman 1993, Magnusson ve Sandström 2004, Szotakova vd 2004). Endojen sentezlenen birçok bileşik, sitokrom P450 enzimlerinin substratı olarak görev yapar. Bu bileşikler: prostaglandin ve lökotrienler dâhil yağ asitleri, steroidler, yiyecek katkı maddeleri ve ilaçlar yanında besinlerle, enjeksiyonla, havadan inhalasyonla ya da deriden absorpsiyonla vücuda giren endüstriyel maddelerdir (Benet vd 1996). Sitokrom P450’ler, endojen ve ekzojen bileşiklerin metabolizmasında önemli olan Faz I enzimlerinin bir ailesini teşkil ederler (Gonzalez ve Yu 2006). Bunlar bakterilerden memelilere kadar çalışılmış tüm türlerde bulunan, yapısal ve fonksiyonel olarak benzer hemoproteinler içeren bir gen süper ailesinin üyesidir (Nelson vd 1996, Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000).

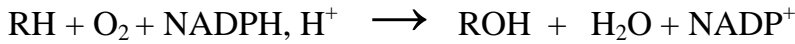
Prokaryotik enzim çözünür bir hemoprotein iken, yüksek organizmalarda membrana bağlıdır. Memelilerde, mitokondriyal iç membranda ve endoplazmik retikulum membranlarında yerleşmiştir (Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000). Sitokrom P450 sistemi, katalitik fonksiyonları bilinmeden önce spektral özellikleri ile tanımlanan proteinlerden oluşmuştur. Bu gruptaki proteinlerin benzersiz bir absorbans

spektrumu vardır. Genellikle mikrozom olarak adlandırılan endoplazmik retikulum veziküllerinden hazırlanan süspansiyondan karbondioksit gazı geçirildikten sonra sodyum ditiyonat gibi indirgeyici bir ajan eklenince spesifik bir absorbans spektrumu elde edilir. Bu işlem sırasında indirgenmiş hem proteinine CO bağlanır ve 450 nm’de pik yapan absorbans spektrumu elde edilir. Bu pigmentlere P450 adı, 450 nm’de absorbans gösterdiği için verilmiştir. Spesifik sitokrom P450 formları, 446 ile 452 nm arasında maksimum absorbans veren dalga boylarına sahiptir. İnsanlarda ve çoğu diğer memelilerde P450’ler; steroid hormonların biyosentezi, antibiyotikler, karsinojenler, organik çözücüler, boyalar, pestisitler, alkoller, çevresel kimyasallar gibi ksenobiyotiklerin aktivasyonu ya da inaktivasyonu, doymamış yağ asitlerinin hücrel mesajcılara oksidasyonu, yağda çözünen vitaminlerin stereo ve regio-spesifik metabolizması gibi reaksiyonların katalizlenmesinde önemli rol oynarlar (Arıncı ve Philpot 1976, Porter ve Coon 1991, Oleksiak vd 2002). Sitokrom P450 enzimlerinin bazı substratları Tablo 1.1’de verilmiştir.

**Tablo 1.1** Bazı sitokrom P450 substratları (Porter ve Coon’dan alınmıştır, 1991).

<b>Ksenobiyotikler (Ekzojen)</b>	<b>Endojen Bileşikler</b>
İlaçlar (asetaminofen)	Steroidler
Karsinojenler (PAH)	Eikosanoidler
Antioksidantlar	Yağ Asitleri
Çözücüler (hekzan)	Yağ hiperoksitleri
Anestetikler	Retinoidler
Boyalar	Aseton
Pestisitler (metil paration)	
Alkoller (etil alkol)	
Petrol ürünleri	
Koku vericiler	

Sitokrom P450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Reaksiyonda substrat (R) alkan, alken, aromatik halka ya da heterosiklik sübstitüentler gibi oksijenasyon için olanak veren bir bölgeye sahiptir. Substrata, iki oksijen atomundan sadece biri katıldığı için bu reaksiyona monooksijenasyon reaksiyonu ve bu enzimlere de sitokrom P450 monooksijenaz enzimleri (EC 1. 14. 14. 1) adı verilmektedir.

Spesifik detoksifikasyon reaksiyonları, çeşitli diyetel veya ksenobiyotik bileşkenlerin varlığında, organizmanın yaşı ve cinsiyetine, genetik yapısına ve yaşam tarzındaki alışkanlıklarına bağlı olarak ya indüklenmekte ya da inhibe olabilmektedir. Hem endojen hem de ekzojen bileşikler tarafından çeşitli sitokrom P450'lerin indüklendiği 1960 yıllarından beri bilinmektedir. Bazı hastalık durumlarında detoksifikasyon aktiviteleri indüklenirken diğer bazı koşullarda bu aktiviteler inhibe olabilmektedir. İnhibisyon iki veya daha fazla bileşkenin aynı detoksifikasyon enzimi için yarışmasından olabilir. Bazı bileşkenler sadece bir detoksifikasyon enzimini seçici olarak inhibe ederken bazıları tüm sitokrom P450 faz I enzimi aktivitesini inhibe etmek için sitokrom P450'nin reaktif bölgesi olan hem demirine direk olarak bağlanırlar. Bazı faz II enzimlerinin genel inhibisyon mekanizması ise gerekli kofaktörlerin eksikliğine dayanmaktadır (Liska 1998).

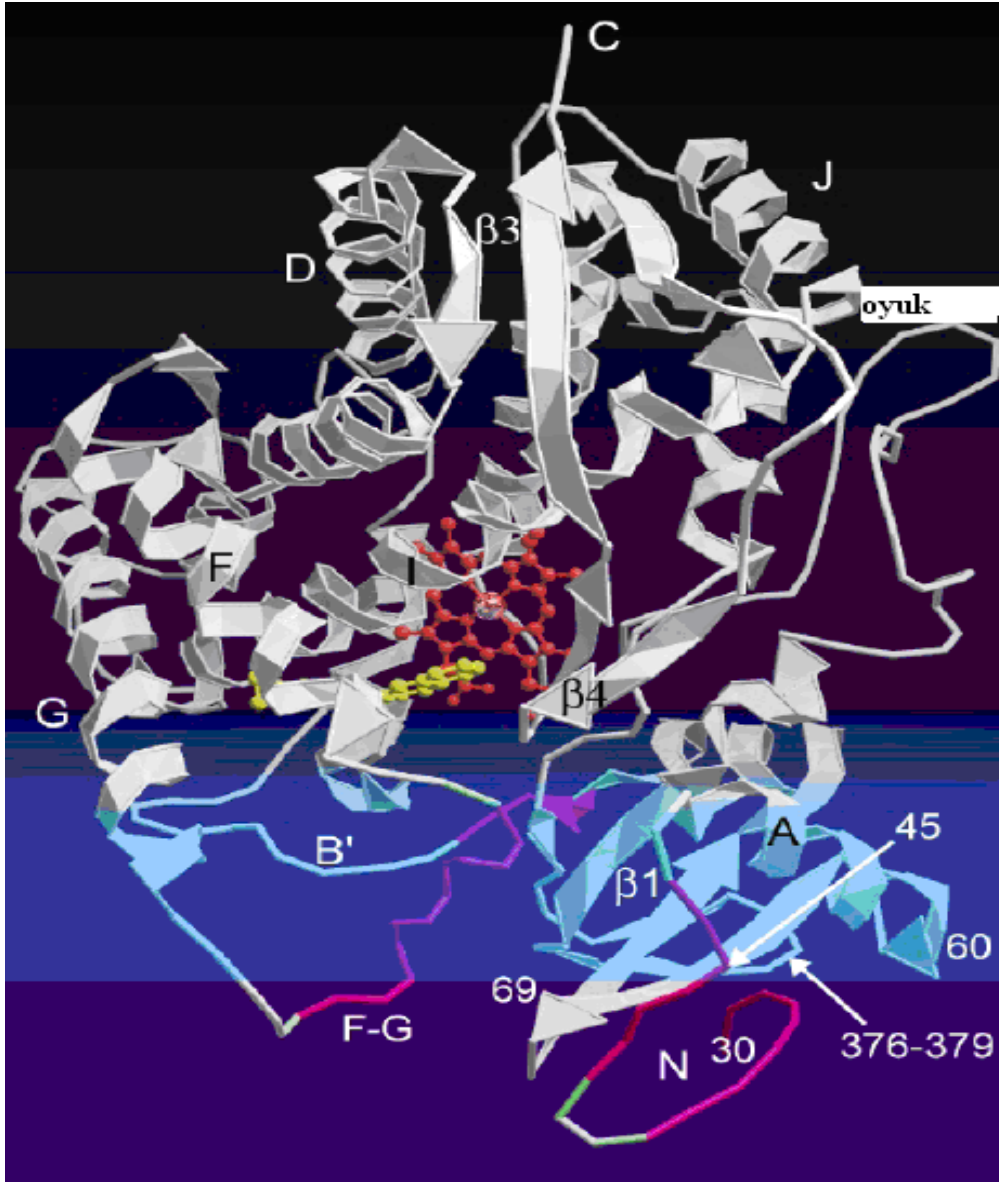
### 1.1.1. Sitokrom P450'lerin karakteristik ve yapısal özellikleri

Sitokrom P450 proteinlerinin aktif bölgesi hidrofobik etkileşimlerle bağlanmış tek bir demir protoporfirin IX içerir ve oluşan hem proteininde hem bir oksijen molekülünün hem de substratların (RH) bağlanabileceği yerler vardır. Hem grubu demir atomunun beşinci ligandı, sistein kalıntısından sağlanan tiyolat anyonudur ve P450'nin olağandışı spektral ve katalitik özelliklere sahip olmasını sağlar. Altıncı ligand yeri değişebilen su molekülü tarafından kullanılmaktadır. Substrat katalizinde demirin indirgenmesi reaksiyonunda O<sub>2</sub> altıncı konuma bağlanmaktadır (Porter ve Coon 1991).

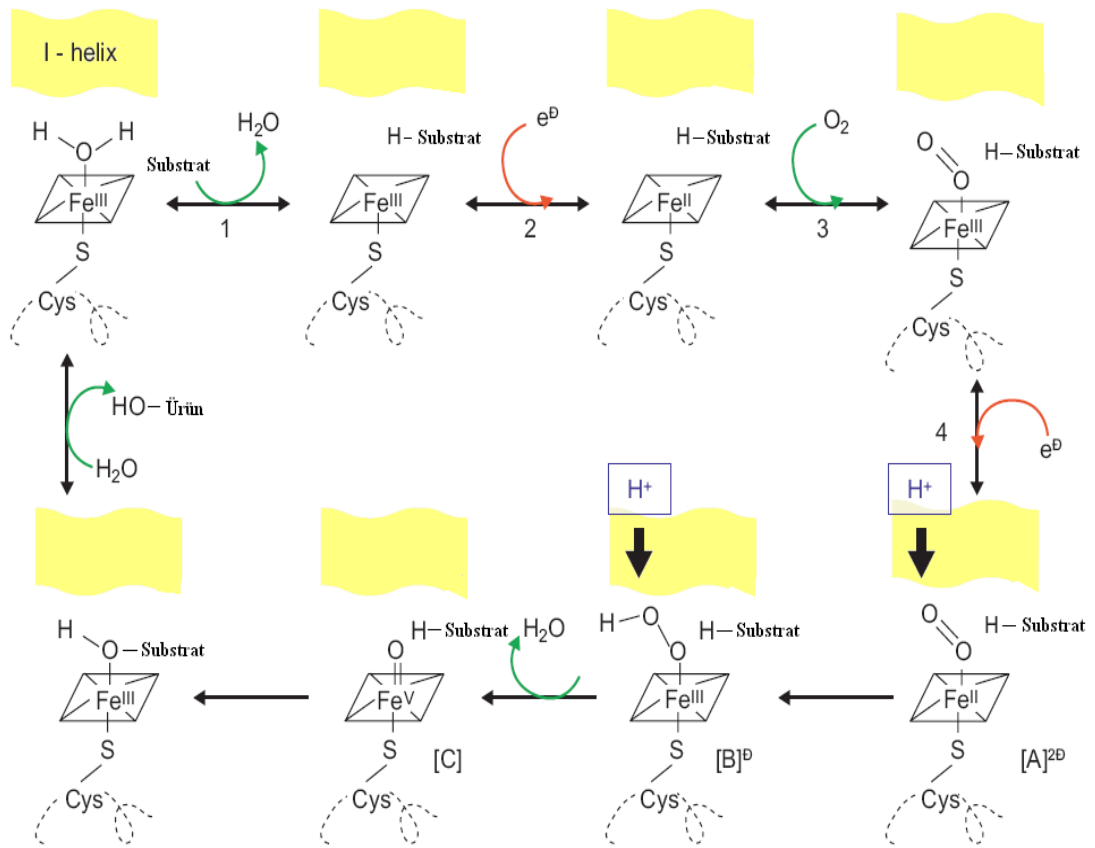
Sitokrom P450 proteinleri arasındaki sekans benzerliği hayli düşüktür (%20'den daha az) ve yalnızca tamamen korunmuş 3 aminoasit içerirler. En yüksek yapısal korunmuş bölge, hem proteini çevresinde, oksijen aktivasyonu ve elektron-proton transferinin genel bir mekanizmasını yansıtan merkez proteinindedir. Bu korunmuş merkez bölgesi 4 heliks demeti (D, E, I ve L), paket, J ve K heliksleri, 2 set  $\beta$  plaka ve bir oyuk yapısından oluşmuştur. Bu bölge; (a) hem demirine beşinci ligand şeklinde bağlanan ve mutlak korunan sistein kalıntısı yanısıra L heliksinden hemen önce hem yapısının proksimal yüzeyinde yerleşmiş olan karakteristik P450 dizisini (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly) kapsayan hem bağlanma boşluğunu "loop"; (b) K heliksi içerisinde yer alan ve merkez yapısını stabilize ettiği düşünülen, mutlak korunmuş Glu-X-X-Arg motifini; (c) hem proteininin distal bölgesinde proton transfer oluşunu oluşturan ve P450 imgesi olarak kabul edilen (Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser) I heliksini merkez bölgesini içerir (Şekil 1.1) (Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000).

Genel olarak, P450'ler Şekil 1.2'de gösterilen reaksiyon döngüsüne girerler. Bilinen tüm sitokrom P450'lerdeki hem demiri, porfirin halkasındaki 4 nitrojen atomuna ve 2 aksiyal liganda bağlıdır. Aksiyal ligandların birinde molekülün karboksil ucuna yakın yerleşmiş sistein kalıntısında bir sülfhidril grubu bulunur. Çeşitli bileşiklerin oksidasyonu sırasında elektronlar NADPH'dan, NADPH Sitokrom P450 redüktaz tarafından sitokrom P450'ye transfer edilir. Hem demiri düşük ve yüksek spinli olmak üzere iki farklı spin durumunda bulunabilir. Düşük ve yüksek spinli durumlar demir atomunu çeviren elektronik alanlar olarak tanımlanabilir. Sitokrom P450 molekülü bir substrata bağlanınca bu elektronik alanlarda etkileşim meydana gelir ve hemdeki demir atomu düşük spinden yüksek spine geçer. Oksidasyon (monooksijenasyon) reaksiyon mekanizmasında, oksijenin hem demirine bağlanabilmesi için hemdeki demir ferrik ( $Fe^{3+}$ ) durumundan ferro ( $Fe^{2+}$ ) durumuna indirgenmelidir. Substrata bağlı, yüksek spin (-170mV), substrata bağlanmayan düşük spine (-270 mV) göre daha fazla pozitif indirgenme potansiyeline sahip olduğu için Sitokrom P450, NADPH'dan elde edilen elektronlarla indirgenebilir durumdadır. İlk elektron transferiyle indirgenen sitokrom P450 daha sonra oksijenlenir ve NADPH'dan ikinci bir elektron oksijene bağlanarak, oksijen radikaline dönüştürülür. Bir iç oksidoredüksiyon neticesinde hidroksillenmiş substratın (ROH) ve suyun oluşumu gerçekleşir, serbest sitokrom P450  $Fe^{3+}$  formunda rejenere olur. Monooksijenasyon reaksiyonunda toplam 2 elektron ( $e^-$ ) gereklidir.

Elektronlar sitokrom P450 molekülüne tek tek transfer edilir (Schenkman 1991). NADPH-sitokrom P450 redüktazdan sitokrom P450'ye elektron transferine lipitlerin yardımcı olduğu gösterilmiştir (Lu ve Lewin 1974).



**Şekil 1.1** Sitokrom P450 proteinlerinin üç boyutlu yapısı. Hem turuncu, substrat sarı renkle gösterilmiştir. Mor bölge endoplazmik retikulum zarını göstermektedir. Epitoplarda kırmızı renkle gösterilmiş olup numaralar onların primer dizindeki yerlerini verir. I heliks substrat bağlanma bölgesine yakın olup heminin hemen yukarisindedir. Hem bağlanma boşluğu hem protoporfirininin arkasında görülür. K heliksindeki mutlak korunmuş Glu-X-X-Arg yapısında arkada olduğundan görülmemektedir (Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000) .



**Şekil 1.2** Sitokrom P450 enzimlerinin katalitik mekanizması (Werck-Reichhart ve Feyereisen 2000).

### 1.1.2. Sitokrom P450'lerin sınıflandırılması ve adlandırılması

Günümüzde sitokrom P450'lerin omurgalı ve omurgasız hayvanlar, bitkiler ve bakterileride içeren ökaryot ve prokaryot organizmalarda bulunduğu gösterilmiştir. Sitokrom P450'lerin birçok reaksiyonu katalizlemelerinden dolayı enzimlerin isimlendirilmesinde sıradan metot yetersiz kalmış ve yapısal homolojiye dayanan sistematik bir adlandırma geliştirilmiştir. Sitokrom P450 enzimleri baz dizilimi benzerliklerine, kontrol eden gen ailelerine ve substrat spesifikliğine göre sınıflandırılmaktadırlar. Bu adlandırma evrensel olarak kabul edilmiştir (Nebert vd 1987). Bu sistemde, CYP terimi sitokromun “cytochrome” ilk iki harfini ve P450'nin ilk harfini temsil eder. Bu terim bir gen ya da sitokrom P450 gibi bir proteinin başlangıcının dizaynı için kullanılır. Aileyi belirlemek için rakamlar verilir ve bunu alt aileyi belirlemek için büyük harflerin kullanılması izler. Özgün P450 formunu tanımlamak için rakamlar kullanılır. Örnek olarak CYP1A2 ve CYP2E1 verilebilir. Günümüzde bilinen 18 memeli P450 gen ailesi 43 alt aileye bölünmüştür

(WEB\_1). Aynı ailenin üyeleri en az %40 homolog amino asit dizisini paylaşır ve aynı alt ailenin üyeleri en az %55 homolog diziyi paylaşır (Nelson vd 1996).

## 1.2. Balık Sitokrom P450'leri

Brodie ve Maickel'in (1962) balıkların ksenobiyotik metabolizması için gerekli enzimlerden yoksun olduğunu söylemelerine rağmen, sucul türler üzerine yapılan çalışmalar bu türlerde sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz sistemin ve sitokrom P450'lerin varlığını çok iyi göstermiştir (Arınç ve Şen 1993, Şen ve Arınç 1998, Kishida ve Callard 2001, Oleksiak vd 2002, Chaty vd 2004, James vd 2005).

Memelilerde olduğu gibi balıklarda da ksenobiyotikler Faz I ve Faz II enzimleri ile katalize edilerek metabolitlerine dönüştürülmektedir. Balıklar tarafından vücutlarına alınan pestisit, petrol ürünleri ve çeşitli endüstriyel atıkların oluşturduğu hidrofobik yapıdaki ksenobiyotikler önce Faz I enzimleri tarafından katalizlenen redüksiyon, oksidasyon ve hidroliz reaksiyonları sonucunda kısmen daha suda çözünür metabolitlere dönüştürülürler. Bu metabolitlerin bir kısmı bundan sonra Faz II enzimleri olarak adlandırılan konjugasyon enzimleri tarafından, daha da hidrofilik yapıda olan sülfat ve glukuronik asit konjugatlarına çevrilerek vücuttan atılırlar (Buhler ve Williams, 1989). Endojen fiziksel faktörler ve çevredeki değişimler balıklardaki sitokrom P450 monooksijenaz aktivitesini oldukça fazla etkilemektedir. Bunlar; steroidler, yağ asitleri, vitamin D, safra asitleri, olgun balığın cinsiyeti ve yaşı, mevsimsel varyasyonlar, ışık periyodu, basınç, tuzluluk ve gürültü gibi diğer stres faktörleridir (Gelinas vd 1998, González ve Piferrer 2003, Chaty vd 2004).

Gerek memelilerde gerekse balıklarda Faz I enzimlerinin en önemlisi sitokrom P450 monooksijenazlardır. Ayrıca P450 monooksijenazların toksik olmayan bazı ksenobiyotikleri daha toksik ve karsinojenik metabolitlerine dönüştürdükleri gösterilmiştir (Arınç ve Şen 1994). Gerek memelilerde, gerekse balıklarda sudaki çözünürlüğü az olan metabolitlerin vücuttan atılmayıp, yağ dokularında biriktiği gösterilmiştir. Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemlerinin pestisitler, ilaçlar, kozmetikler, koruyucu gıda katkı maddeleri ve çok halkalı hidrokarbonlar (benzopiren, naftoflavonlar) gibi vücuda yabancı olan maddeleri metabolize ettikleri gibi, yağ asitleri, kolesterol ve steroid hormonları gibi vücudun normal kimyasal maddelerini de metabolize ettikleri saptanmıştır (Arınç ve

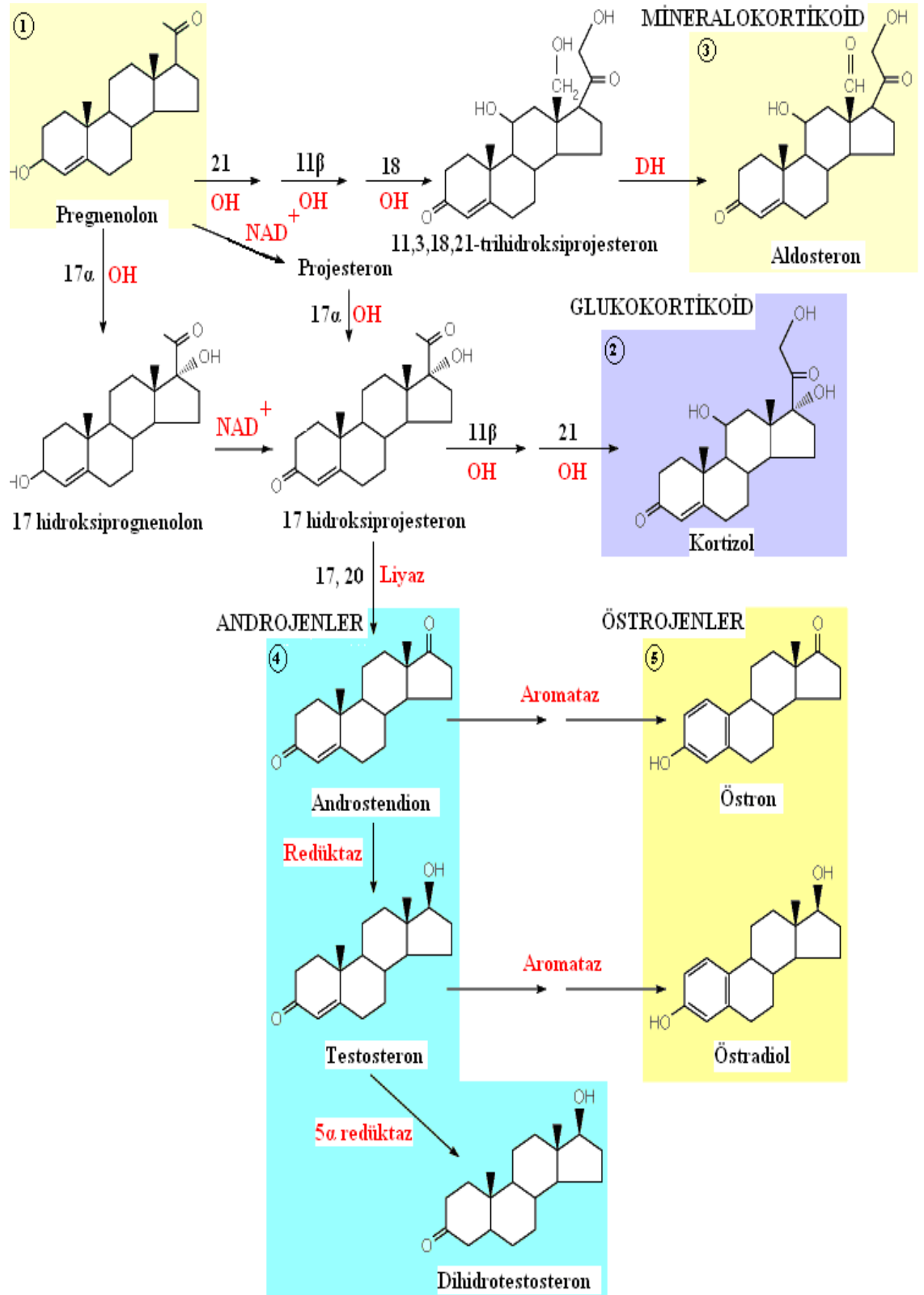
Philpot 1976, James vd 2005). 1976 yılında dünyada ilk kez Arınç ve Philpot, balık monooksijenaz enzim sistemini sitokrom P450, sitokrom P450 redüktaz ve fosfolipit olarak bileşkenlerine ayırmış, bileşkenleri kısmen saflaştırmış, monooksijenaz aktivitesini test tüpünde yeniden oluşturarak, balık sitokrom P450'sinin biyokatalitik olarak aktif olduğunu göstermiştir (Arınç ve Philpot 1976). Yapılan çalışmalar, balıklardaki P450 izozimlerinin, endojen ve ekzojen organik kimyasalların metabolizmasında, cinsiyet hormonlarının sentez ve yıkımında ve kimyasal karsinogenezdeki rollerinin ne kadar önemli olduğunu göstermiştir (Arınç ve Adalı 1983).

CYP1A, CYP2B, CYP2E, CYP2M, CYP2N, CYP2K, CYP3A, CYP11A, CYP17, CYP19, CYP26, CYP46, CYP51 aileleri ve daha birçoğuna ait olan sitokrom P450'nin çoklu formları memelilerde olduğu gibi çeşitli balık türlerinde de bulunur. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, Nelson (2003), 18 memeli ailesinin 17'sinin kirpi balığında da bulunduğu belirtilmiştir. Sadece bir P450 ailesi, CYP39, bu balık türünde yoktur (Nelson 2003). Poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller ve dioksin tipi toksik çevresel kirleticiler gibi ekzojen bileşikler ve testosteron, projesteron ve araşidonik asit gibi endojen bileşikler içeren substratlar balık monooksijenaz sistemi tarafından metabolize edilirler. Bu substratlar balık sitokrom P450 monooksijenaz sisteminin çeşitli izoformları tarafından epoksidasyon, hidroksilasyon, dealkilasyon ve oksidasyon reaksiyonları yolu ile metabolize edilirler (Arınç ve Şen 1993, Amet vd 1997, Oleksiak vd 2000, Oleksiak vd 2002).

### **1.3. Steroid Hormonlar**

Kolesterol tüm steroid hormonların biyosentetik kaynağıdır. Bulunduğu asıl organlar gonadlar ve adrenal korteks dışında hamile kadınlarda plasentadır. Steroid hormonlar; projestinler (projesteron), glukokortikoidler (kortizol ve kortikosteron), mineralokortikoidler (aldosteron), androjenler (androstendion ve testosteron), ve östrojenler (östron ve östradiol) olmak üzere beş gruba ayrılırlar (Şekil 1.3). Steroid hormonların sentez sonrasında depo edilmemeleri en genel özellikleridir. Sonuç olarak steroid hormon düzeyi beyinden gelen sinyaller ile sentezlerinin düzenlenmesi ile kontrol edilir. Beyinin hipotalamusuna ulaşan herhangi bir sinirsel uyarı buradan mekanizmayı işleten çok az miktarlardaki özel hormonların salınımına yol açar, bunlara





**Şekil 1.3** Steroid hormonların biyokimyasal sentezleri. Yuvarlak içindeki numaralar, hormonların ait oldukları sınıfı göstermektedir. OH=hidroksilaz; DH=dehidrojenaz (Mathews vd 2000).

serbestleştirici faktör denir. Örneğin, kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH), merkezi sinir sisteminden (MSS) gelen uyarılara yanıt olarak hipotalamustaki hücrelerden salınır. CRH ise kortikotropin veya adrenokortikotropik hormonunun (ACTH) hipofizden salınımını uyarır (Mathews vd 2000).

Steroid hormon sentezi, kolesterol esterlerinin hidrolizi neticesinde oluşan kolesterolün hedef dokularda mitokondri içerisine alınmasıyla aktive edilir. Kolesterol dezmolaz denilen enzim kompleksi, C-20 ve C-22 pozisyonunda kolesterol yan zincirini hidroksilleyip keser ve kolesterolü pregnenolona dönüştürür. Dezmolaz kompleksi, iki sitokrom P450 hidroksilaz ve bir liyaz içerir. Pregnenolon ise dehidrojenasyon ve çift bağ izomerizasyonu ile projesterona dönüştürülür. Projesteronun diğer steroid hormonlara dönüşümü şekil 1.3'te gösterilmiştir. Bir adrenal korteks enzimi ile C-21 hidroksilasyonunu, aldosteronu veren bir aldehit grubu oluşturmak üzere ikiden fazla hidroksilasyon ve dehidrojenasyon izler. C-17 pozisyonunda projesteronun hidroksilasyonu diğer tüm steroidlerin öncüsü olan 17  $\alpha$ -hidroksiprojesteronu oluşturur. Bu ara ürünün iki kez hidroksilasyonu kortizolü verir (böbrek üstü bezlerde). Gonadal bir enzim, C-17 pozisyonunda 17-hidroksiprojesteronun yan zincirini keserek androjen ve östrojenlerin öncüsü olan androstendionu verir. Androjenlerin östrojenlere dönüşümünü aromataz denilen bir enzim kompleksi düzenler. Bu enzim kompleksi tarafından katalizlenen reaksiyonun hayvan hücrelerinde aromatik halkanın sentezi için bilinen tek yol olması dikkat çekicidir. Testosteron C-5 pozisyonunda indirgenerek daha güçlü bir androjen olan 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona dönüştürülür (Mathews vd 2000).

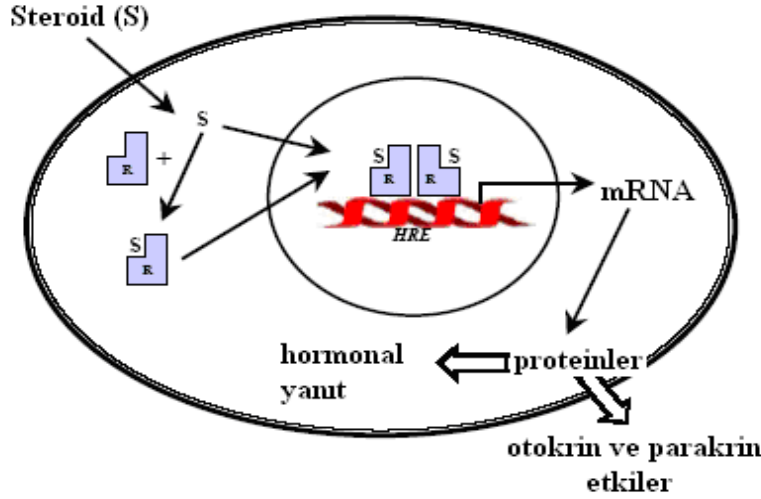
#### 1.4. Östrojenlerin Endokrinolojisi ve Aromatazın Rolü

Östrojenler, dişilerin ikincil eşey karakterlerinin gelişimini etkileyen ve dişi üremesi için gerekli olan eşey steroid hormonlarıdır. Dişi eşey steroid hormonlarının diğer büyük sınıfı yine dişi üremesi için gerekli olan projestinlerdir. Kimyasal olarak, doğal olarak meydana gelen östrojenler C<sub>18</sub> steroidleridir. En etkili endojen östrojen östradioldür. Doğal olarak meydana gelen projestinler C<sub>21</sub> steroidleridir ve bunlar A halkasında 3-keto-4-en yapısına ve C-21 pozisyonunda bir ketona sahiptirler. En etkili endojen projestin, projesterondur (Williams ve Stancel 1996).

Kadınlarda menapoz öncesinde östrojenin büyük bir kısmını yumurtalıklar üretmektedir. Gebelik sürecinde östrojen biyosentezinin ana kaynağı plasentadır. Menapoz sonrasında ise östrojen iki aşamada üretilir. Böbrek üstü bezleri androstendion adı verilen erkeklik hormonunu üretir. Aromataz enzimi de bu androstendionu östrojene çevirir. Erkeklerde ise testislerde üretilmektedir. Bu hormonların küçük miktarları ayrıca her iki eşyede, adrenal korteks, adipoz doku, kemik, kan damarları, düz kas hücreleri, hipotalamus ve ön hipofizden de sentezlenir (Simpson vd 1999).

Östrojen etkisinin biyokimyasal mekanizması Şekil 1.4'te gösterildiği gibi bağıl spesifik, yüksek affiniteli östrojen reseptörleriyle gen ekspresyonunun regülasyonu ve protein biyosentezinin indüklenmesi şeklindedir. Bu reseptörler, steroid ligandlarına yüksek affinite ile bağlanabilen ve spesifik DNA bölgeleri ve kromatin ile ilişkili diğer proteinlerle etkileşerek ligand-bağımlı transkripsiyonel faktörler şeklinde rol oynayan çözünebilir intraselüler proteinlerdir. Östradiol için reseptör bağlanma bölgeleri hedef hücrelerin nükleusunda yer alır ve hem yüksek affinite ( $K_D = 10^{-11}$  ile  $10^{-10}$  M) hem de yüksek spesifite gösterirler. Östradiol, östrojen reseptörüne bağlandığında, östrojen-reseptör kompleksinde konformasyonel bir değişiklik olur ve steroid-reseptör kompleksinde homodimerleşme olur. Steroid-reseptör homodimerleri, ilgili genlerin promotor bölgelerinde bulunan hormon sorumlu elementler (HRE<sub>s</sub>) veya östrojen sorumlu elementler (ERE<sub>s</sub>) şeklinde bilinen hücresel DNA'nın belirli bölümleri ile etkileşirler. Nükleer steroid reseptör komplekslerinin DNA'ya bağlanması ve çeşitli nükleer transkripsiyonel faktörlerle etkileşimi, mRNA üretmek için genin transkripsiyonunu başlatır. Yükselmiş mRNA düzeyleri, endoplazmik retikulumda artmış protein sentezi ile sonuçlanır. Enzimler, reseptörler ve salgılama faktörlerini içeren bu proteinler, büyüme ve farklılaşmayı sağlayacak olan hücre fonksiyonunu düzenlerler. Başlangıçta, östrojen reseptörü denen tek bir proteinin östrojenlerin tüm faaliyetlerinden sorumlu olduğuna inanılıyordu. Son zamanlarda, ikinci bir östrojen reseptörü tanımlandı ve bu iki östrojen reseptörü ER $\alpha$  (çalışılan ilk ER) ve ER $\beta$  (keşfedilen ikinci ER) şeklinde gösterilmektedir. Bu iki reseptör büyüklük ve doku dağılımı bakımından farklıdırlar. Dişi üreme sistemi ve meme bezlerinde baskın olan ER $\alpha$ 'dır, halbuki ER $\beta$  damar endotelial hücrelerinde, kemik ve erkek prostat

dokularında asıl östrojen reseptörüdür. Östradiol hem ER $\alpha$  hem de ER $\beta$  için benzer affiniteye sahiptir (Weigel ve Rowan 2001).



**Şekil 1.4** Steroid hormon etkisinin genel mekanizması (Weigel ve Rowan 2001).

Östrojenlerin en önemli hedefi meme dokusudur. Östrojenler meme hücrelerinin proliferasyonunu teşvik edebilmekte ve hormon bağımlı meme kanserinin büyümesini arttırabilmektedirler. Kadınlarda kanser için birincil bölge meme olduğundan oldukça fazla miktardaki araştırmada, meme kanserini ve bunun büyümesini etkileyen faktörleri anlama üzerine odaklanılmıştır. Östradiol, gen ekspresyonu ve östrojen reseptör mekanizması yolu ile meme kanseri hücrelerinde birkaç proteinin üretimini teşvik edebilmektedir. Bu proteinler, meme ve endometrium kanserinin fonksiyonu ve büyümesi için önemli intraselüler proteinleri, tümör büyümesini ve metastazı etkileyebilen salgılanmış proteinleri içerir (Simpson vd 2000). Bu karsinojenik etki, antiöstrojenler aracılığı ile reseptör blokajı yapılarak veya aromataz inhibitörleri ile östrojen sentezi inhibe edilerek önlenabilir. Tamoksifen gibi antiöstrojenler, yalnızca reseptör blokajı yaptıklarından, hücre proliferasyonunu önleyebilirlerse de genotoksik metabolitlerin oluşumunu önleyemezler. Hâlbuki aromataz inhibitörleri, plazma östrojen düzeylerini düşük tutarak, hem hücre proliferasyonu, hem de genotoksik metabolit oluşumuna etkilidirler. Bu nedenle aromataz inhibitörlerinin meme kanseri gelişimini önlemede daha etkin oldukları söylenmektedir (Buzdar ve Howel 2001). Son zamanlarda, menapoz sonrasındaki kadınlarda bilinmesi gereken fonksiyonları

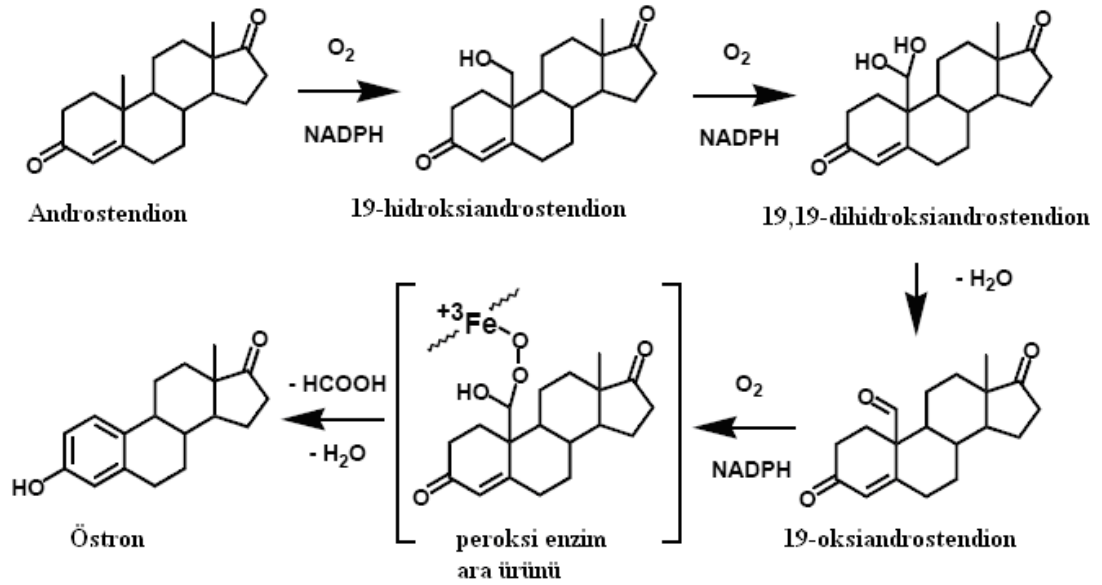
araştırmak ve Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının ilerlemesini yavaşlatmak ve engel olmak için östrojen yer değiştirme terapisi rapor edilmiştir (Williams 1998). Aromataz enzim aktivesi ölçümleri immünohistokimya ve RT-PCR analizi kullanılarak insan meme kanseri dokusunda, normal meme dokusundan daha yüksek düzeyde ifade edildiği gösterilmiştir (James vd 1987). Hücre kültürü, aromataz transfekte edilmiş meme kanseri hücreleri kullanılarak yapılan hayvan deneyleri ve transgenik fare çalışmaları meme tümörü oluşumunda *in situ* üretilmiş östrojenin dolaşımında bulunan östrojenden daha önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Tekmal vd 1996). Ayrıca, tümör aromatazının hem otokrin hem de parakrin tarzda meme kanseri gelişimini stimüle ettiği gösterilmiştir. *In situ* östrojen biyosentezinin baskılanması, aromataz ekspresyonunun önlenmesi veya meme tümörlerinde aromataz aktivitesinin inhibisyonu ile kontrol edilebilmektedir. Her ne kadar meme kanseri dokusunda aromataz ekspresyonunun kontrol mekanizması henüz tamamen anlaşılmadı ise de, aromataz inhibitör terapisi, anti-östrojen terapisi başarısızlığa uğramış hastalarda alternatif tedavi için düşünülmektedir.

Östrojenler, memeli olmayan omurgalılarda hepatic vitellojenez, eşey hücresi gelişimi, sıcaklık-eşey belirlenmesi, eşeysel farklılaşma, memeli gonad gelişimi, beynin eşeysel farklılaşması ve karsinogenez şeklindeki birçok fizyolojik ve davranışsal işlemlerde önemli rolleri olan hormonlardır (Strobl-Mazzulla vd 2005). Sertoli hücrelerinde aromataz tarafından lokal olarak üretilen östrojenler spermatogenez için önemlidirler (Brodie vd 2001). Östrojen reseptörleri, sertoli hücreleri, leyding hücreleri, epididimis ve yardımcı eşey organları gibi erkek üreme dokularında mevcuttur (Lombardi vd 2001). Kemirgenlerin gebelik gelişimi sürecinde, beyin içinde testosteronun östrojene aromatisasyonu, erkek beyninin eşeysel farklılaşmasını etkileyebilecek hipotalamusun yapısal organizasyonunda anahtar bir rol oynar. Gerçi, halen gebelik gelişimi sürecinde insan beyninin erkekleşmesi üzerine östrojenin benzer etkilerini göstermek için kesin bir kanıt yoktur (Cooke vd 1998).

### **1.5. Sitokrom P450 Aromataz (EC 1. 14. 14. 1)**

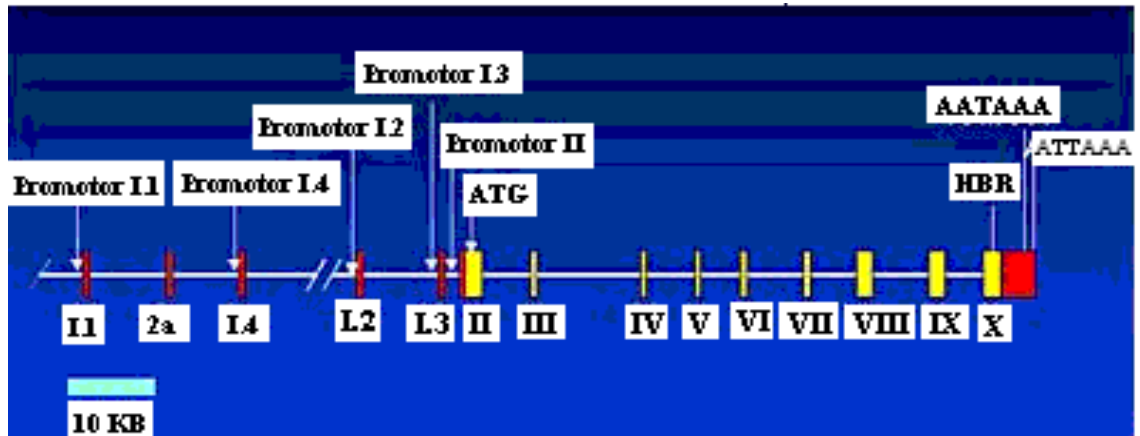
Aromataz, testosteron ve androstendion gibi androjenleri östradiol ve östron gibi östrojenlere dönüştüren ve östrojen biyosentezinden sorumlu olan sitokrom P450

süperaillesinin üyesi olan bir enzim kompleksidir. Bu enzim kompleksi hücrenin düz endoplazmik retikulumunda bulunur ve iki ana proteinden ibarettir. Birinci protein olan sitokrom P450 aromataz, C<sub>19</sub> steroidlerini (androjenler) fenolik A halkası içeren C<sub>18</sub> steroidlerine (östrojenler) dönüştüren bir hem proteindir. İkinci protein olan NADPH-sitokrom P450 redüktaz ise elektronları sitokrom P450 aromataza transfer eder. Sitokrom P450 aromataz ve NADPH-sitokrom P450 redüktaz proteinleri enzimatik aktivite için gereklidir. Aromataz geni, CYP19 şeklinde kodlanmış olup sitokrom P450 aromatazı kodlar (Simpson vd 1994). Bu gösterim C<sub>19</sub> açısal metil grubunun oksijen tarafından atak bölgesi olduğu gerçeğinden temel almıştır (Thompson ve Siiteri 1974). Bir mol substratın bir mol östrojene dönüşümünde 3 mol NADPH ve 3 mol oksijen kullanılır. İlk iki oksijen molekülü standart hidroksilasyon mekanizmaları ile C<sub>19</sub> açısal metil grubunu okside etmek için kullanılmakta, üçüncü oksijen molekülü ise C<sub>19</sub> açısal metil grubu üzerine peroksidatif atak yapmaktadır. Dolayısıyla bu 3 mol oksijen molekülünün hepsi östrojenlerin fenolik yapı karakteristiklerini oluşturmak için A halkasının aromatisasyonu ile aynı zamanda C<sub>19</sub> açısal metil grubunun formik asite oksidasyonunda kullanılmış olur (Şekil 1.5) (Simpson vd 1994). Bu enzim ilk defa insan plasenta dokularında rapor edilmiştir (Ryan 1959). Aromataz aktivitesi meme dokusunda *in vitro* gösterilmiştir. Ayrıca, aromatazın ekspresyonu, meme dokusu içinde veya etrafında, aromataz enzimini içeren erkek ve kadınların beyнинin çeşitli bölgelerinde, erkek testisinde ve erkek ve kadınların kemiklerinde en yüksek düzeydedir (James vd 1987).



Şekil 1.5 Aromataz tarafından steroid hormon biyosentezi (Simpson vd 1994).

Aromataz geninin büyüklüğü 70 kilo bazı aşmakta olup 9 ekzondan ibarettir. İnsan aromataz geni 15q21.1 kromozomu üzerinde yer almaktadır (Simpson vd 1994). 3.4 kb uzunluktaki cDNA yaklaşık 55.000 dalton molekül ağırlığındaki 503 amino asitlik bir proteini kodlar. Aromatazın çeşitli dokularda regülasyonu komplekstir ve CYP19 geninin upstream bölgesinde birkaç doku spesifik promotor bölgeleri tanımlanmıştır (Means vd 1991, Simpson vd 1993). Bu doku spesifik promotorlar PI.1, PI.2, PI.3, PI.4 ve PII dir. PII promotoru yumurtalık, testis ve meme kanseri dokularında kullanılmaktadır. Promotor I.3 ve PI.4 adipoz doku bölgelerinde kullanılan asıl promotorlardır. Promotor PI.1 ve PI.2 plasental dokularda kullanılan promotorlar olup regülasyonları halen geniş bir şekilde araştırılmaktadır (Şekil 1.6) (Simpson vd 1997).



Şekil 1.6 İnsan aromataz geni (Simpson vd 1994).

İnsanlarda CYP19 geni tek kopya halinde bulunur ve doku spesifik ekspresyonunun kontrolü, "alternatif splicing" mekanizması ile yazılmayan 5' ekzon ve doku spesifik promotör kullanımı ile sağlanmaktadır (Strobl-Mazzulla vd 2005). Diğer taraftan domuzlarda, çoklu doku spesifik aromataz izoformları 3 farklı CYP19 geni tarafından kodlanmıştır (Graddy vd 2000, Strobl-Mazzulla vd 2005). Bununla beraber kemikli balıklarda, aromatazın biri beyinde (P450aromB; CYP19A2) ve diğeri yumurtalıkta (P450aromA; CYP19A1) olan 2 farklı izoformu vardır (Tchoudakova ve Callard 1998, Kishida ve Callard 2001, Strobl-Mazzulla vd 2005). Filogenetik analizler, farklı türler arasında beyin aromataz formlarının ayrı ayrı yumurtalık aromatazlarından daha yüksek özdeşlik paylaştığını göstermiştir (Blazquez ve Piferrer 2004, Strobl-Mazzulla vd 2005).

Sitokrom P450 aromataz, balık, amfibi, sürüngen ve kuşları içeren birçok omurgalının eşeysel farklılaşmasında androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalize ettiği gösterilmiş steroidojenik bir enzimdir. Yavru balıkların ekzojenik eşey steroidleri ile muamelesinin fonksiyonel eşey değişikliği ile sonuçlanmasından beri bu enzime özel bir merak uyanmıştır (Kwon vd 2001). Her ne kadar eşey farklılaşmasında aromataz aktivitesinin (AA) rolü daha ileri araştırmaya gereksinim duysa da, aromatazın yumurtalığa ait steroidojenik yolak sonunda androjenden östrojen üretimi ve böylece eşey farklılaşması işleminin kontrolünde anahtar rol oynayabileceği gerçeğini gösteren çok sayıda çalışma vardır (Jeyasuria ve Place 1998). Aromatazın inhibisyonu balık, sürüngen ve kuşlarda dişilerin erkekleşmesiyle sonuçlanmıştır (Guiguen vd 1999, Kwon vd 2001). Özel bir aromataz inhibitörü ile muamele edilmiş kral salmonun (*Oncorhynchus tshawytscha*) eşeysel olarak farklılaşmamış genotipik dişileri fenotipik erkek şeklinde gelişmiş, bu da aromatazın eşey farklılaşmasındaki önemini göstermiştir (Kwon vd 2001). Benzer sonuçlar, gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Guiguen vd 1999), japon pisi balığı (*Paralychthys olivaceus*, Kitano vd 2000) ve nil tilapyasında (*Oreochromis niloticus*, Kwon vd 2000) da elde edilmiştir. Son zamanlarda, hem genetik hem de çevresel eşey tayini yapabilen nil tilapyasında, aromatazın baskılanması erkek farklılaşmasında gerekli olmakla beraber aromataz yumurtalık farklılaşmasında da kesin bir rol oynar (D'Cotta vd 2001, Kwon vd 2001).



Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge (SRY), memelilerde iyi bir şekilde karakterize edilmiştir (Guiguen vd 1999) ve memeli eşey belirlenmesinde ilk aktör olarak arz edilmiştir (Koopman vd 1991, Guiguen vd 1999). Bununla beraber, balık ve diğer aşağı omurgalılarda SRY'nin eşiti bulunamamıştır (Ito vd 1995, Guiguen vd 1999). Ayrıca, aşağı omurgalılarda fenotipik eşey farklılaşması sıcaklık (balık, amfibi ve sürüngenler), sosyal faktörler (balık), ksenobiyotikler (balık ve sürüngenler) ve hormonal muameleler (balık, amfibi, sürüngen ve kuşlar) gibi çevresel faktörlere memelilerden daha duyarlıdırlar. Steroid hormonlarla muamelenin, fenotipik eşeyde fonksiyonel eşey dönüşümünü kısmen veya tamamen indüklediği gösterilmiştir. Onun için bu hormonlar memeli olmayan omurgalılarda eşey farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadırlar (Guiguen vd 1999). Medakada (*Oryzias latipes*), Yamamoto'nun öncü deneyleri steroidlerin fenotipik eşey dönüşümünü indüklemeye aktif olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlardan steroidlerin, östrojenlerle dişilerde ve androjenlerle erkeklerde endojen indükleyici olduklarını ileri sürmüştür (Yamamoto 1969). Bundan sonra, birçok çalışma balıkta eşey farklılaşması üzerine steroid hormonların etkisi üzerine odaklanmıştır (Guiguen vd 1999, Kwon vd 2000, Melo ve Ramsdell 2001).

Beyinin östrojenlerin hedefi olduğu detaylı bir şekilde tespit edilmiştir (Kishida ve Callard 2001). Her ne kadar östrojen gonadlarda üretilen bir hormon şeklinde kabul edilse de östrojenin beyindeki hedef bölgelere ulaşımı, plazma östrojen bağlanma proteini ve nöral östrojen metabolize eden enzimlerin yüksek düzeyleri ile sınırlandırılmaktadır. Bu nedenle östrojenin belirli nöral faaliyetleri beyinde androjenin östrojene kendiliğinden olan aromatzasyonuna bağlıdır (Simpson vd 1994, Kishida ve Callard 2001). Yeni doğmuş kemirgen ve insanların hipotalamik preoptik bölge (HPOA) ve limbik sistemlerinde P450 aromataz enzim aktivitesinin keşfi; nöral ER uyarımlarının aromataz aktivitesinin zamanlamasına ve nöroanatomik yerleşimine bağlı olduğunu gösteren araştırmalara yol göstermiştir (Kishida ve Callard 2001). Deneyler, östrojenin nöral proliferasyon, hayatta kalma, morfoloji, sinaptojenez ve yetişkin beyninin birçok farklı bölgesinde farklı fonksiyonları regüle ettiğini göstermiştir (McEwen 1994).

Beyinde testosteronun östrojene dönüşümü, nöral steroid faaliyetinin özgüllüğünü araştırmayı temel alan çalışmalarda ilk olarak ispatsız bir şekilde ifade edilmiş ve bu dönüşümü katalizleyen enzimin (aromataz) memelilerin beyinde bulunduğu ilk olarak

1970'li yılların başında doğrulanmıştır. Sonraki çalışmalar, omurgalı türlerin geniş bir bölümünde enzimatik aktivitenin genel dağılımını artan doğruluk ile tanımlamışlardır (Balthazart ve Ball 1998). En yüksek aktivite preoptik, hipotalamik ve limbik sistemlerin spesifik bölümlerinde lokalize olmuştur (Roselli vd 1985, Schumacher ve Balthazart 1987, Vockel vd 1990, Balthazart ve Ball 1998). Bu aromatazca zengin bölgeler, östrojen reseptörlerini (ER<sub>s</sub>) içeren beyin bölgeleri ile büyük oranda çakışır, bu da "lokal olarak üretilen östrojenler bu intrasellüler östrojen reseptörlerine bağlanarak biyolojik etkilerini sarfederler" fikrini destekler (Balthazart ve Ball 1998).

Kemikli balıklar, sinir gelişimi ve nöroplastisitenin ömür boyu devam eden işlemlerinde, beyinde oluşmuş östrojenin (nöroöstrojen) önemini araştırmak için ideal deney hayvanlarıdır çünkü fevkalade yüksek aromataz aktivitesine sahiptirler. Nöral P450 aromataz ekspresyonunun aşırı düzeyleri bugüne kadar incelenmiş tüm kemikli balık türlerinde bulunmuştur. Japon balığı (*Carassius auratus*) HPOA'sindeki aromataz enzim aktivitesi, yetişkin sıçan, fare, tavşan ve insan beyninin buna karşılık gelen bölümlerinden 100 ila 1000 kat ve Japon balığı yumurtalığından ise 10 kat daha yüksektir (Kishida ve Callard 2001, Strobl-Mazzulla vd 2005). Aromataz aktivitesinin beyinde yumurtalıktan daha yüksek olduğu levrekte (*Dicentrarchus labrax*) de gösterilmiştir (González ve Piferrer 2003). Her ne kadar beyin aromatazının bu yüksek düzeyinin uyumsal önemi iyi anlaşılammış olsa da, yetişkin kemikli balık tarafından göz önüne serilmiş, nöroplastisite ve nöral rejenerasyon yeteneği ile ilgili olduğu gözlenmiştir (Clint ve Zupanc 2001, Strobl-Mazzulla vd 2005).

HPOA'ye ek olarak, aromataz enzim aktivitesi ve immünolojik olarak işaretlenmiş nöronlar ve fiberler; retinada, telensefalon, orta beyin, arka beyin ve omiriliğin tanımlanmış duyuşal ve ön motor yolaklarında geniş bir şekilde yayılmıştır (Gelinas ve Callard 1993, 1997, Kishida ve Callard 2001). Bu yetişkin balık beyninin nörojenez için olağanüstü bir potansiyeli elinde bulundurması ile ilgili olabilmektedir. Bu sadece beynin yaşam boyunca büyümeye devam etmesinden değildir, ayrıca büyümeyi sağlamak için nöral hasardan sonra da fonksiyonel rejenerasyon olabilmektedir (Stuermer vd 1992, Kishida ve Callard 2001). Nöroöstrojen faaliyetleri bir nörotropik faktör şeklinde olduğu için nöral P450 aromataz izoformunun nöral proliferasyon ve farklılaşmasının yüksek olduğu erken MSS gelişimi aşamasında ifade olabileceği sonucu çıkarılmıştır (Kishida ve Callard 2001). Zebra balığında (*Danio rerio*) da beyin

aromatazının başlıca hipotalamus, hipofiz ve duyu organlarında ifade edildiği ve bu bölgelerde östrojen üretiminin merkezi sinir sisteminin gelişimi aşamasında nöroendokrin faaliyetleri, eşeyssel davranışları ve eşeyssel farklılaşmayı etkilediği gösterilmiştir (Tong vd 2001, Kuhl vd 2005). MSS’de östrojen ayrıca, nöral farklılaşma ve büyümeyi ilerleterek sürekli gelişim etkisine de sahiptir. Ayrıca, nöral hayatta kalma ve onarım ile de ilişkilidir (Belcher ve Zsarnovszky 2001, Solum ve Handa 2002, Kuhl vd 2005). Naftolin vd (1975), P450 aromatazın varlığını katalitik bir assay kullanarak ilk olarak sıçan ve insan beyinde tespit etmişler ve sonradan diğer birçok omurgalının beyinde de tanımlanmıştır. MSS’deki aromatazasyon nöral androjen etkilerinin tam olarak yansıtılmasında kritik bir rol oynar ve hem organizasyonel hem de aktivasyonel etkilere aracılık eder (Gelinas vd 1998). Yine MSS’de aromataz aktivitesi memeli limbik sistemine homolog olan ön beyin yapılarında (örneğin; telensefalon) yüksek düzeylerde ve orta / arka beyin yapılarında (beyincik, optik loplara, medulla), omirilik ve retinada düşük fakat önemli miktarlarda bulunmaktadır (Pasmanik ve Callard 1985, Gelinas ve Callard 1993, Gelinas vd 1998). Kemikli balık hipofizi de yüksek aromataz düzeylerine sahiptir, ancak enzimin artmış ekspresyonu aynı zamanda her yerde mevcut değildir çünkü yumurtalık ve karaciğerde daha düşük veya tespit edilemeyen aktiviteye sahiptir.

Japon balığı beyindeki yüksek enzim aktivite düzeyleri ön beyinde mevsime bağlı olarak 2–6 kat değişmektedir. Gonad ağırlığının maksimum ve steroid miktarının yüksek olduğu üreme mevsiminde (Nisan-Mayıs) enzim aktivitesi en can alıcı noktaya ulaşmaktadır. Memeli ve kuşlardakinin aksine, erkek ve dişi üreme döngüsünün geçici olarak eş zamanlı olmadığı Mayıs ayı dışında, Japon balığının beyinde eşey farklılığı gözlenmemiştir. (Gelinas vd 1998). Levreğin farklı beyin bölgelerinde aromataz aktivitesinin dağılımını araştırmak için beyinler üreme sezonunun zirvesinde (Şubat ayında) yetişkin erkek ve dişi balıklardan elde edilmiş ve esas ana parçalarına disekte edilmiştir. Aromataz aktivitesinin ön beyinde (koku soğancığı, telensefalon, hipotalamus ve hipofiz) en yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur. Daha düşük düzeyler orta ve arka beyinde özellikle beyincik ve medullada saptanmıştır. Ayrıca incelenen bölge ne olursa olsun erkeklerde dişilerden devamlı olarak daha yüksek aromataz aktivitesi (ortalama %60 ve daha yüksek) elde edilmiştir. Bu bölgeler özellikle telensefalon, hipotalamus, hipofiz ve koku soğancığı şeklindedir (González ve Piferrer

2003). Japon balığı beyninin, aromatize olma potansiyelindeki steroid etkileri ve bunların mevsimsel değişimleri üremede önemli bir rol ifade etmektedir (Gelinis vd 1998).

Çoğunlukla memelileri temel alarak yapılan çalışmalarda aromataz aktivitesi beyin ve karaciğerde gösterilmiştir (Simpson vd 1994). Kemikli balıklarla yürütülen daha önceki birkaç çalışmada, karaciğerin aromataz aktivitesi ve ifadesi açısından negatif olduğu bulunmuştur (Kwon vd 2001). Buna karşılık hepatik aromatazın varlığı memelilerde belgelerle ispat edilmiş ve hem olgun (González 1992, González ve Piferrer 2003) hem de olgunlaşmamış sığanlarda (Katagiri vd 1998, González ve Piferrer 2003) da bulunmuştur (González ve Piferrer 2003). Karaciğer tüm omurgalılarda P450 enzimlerinin yüksek bolluğu ile bilinir, fakat östrojen faaliyeti için tayin edilmiş bir hedef olan yumurta yumurtlayan omurgalılardaki bu organda aromatazın kesin fonksiyonu açık değildir. Yeşil kurbağada (*Rana esculenta*) hepatik aromataz, testosteronun östradiolle dönüşümünden sorumludur ve hepatik vitellojen sentezinde yumurtalıktan salgılanan östradiole olası bir tamamlayıcı şeklinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Asisi vd 2000, González ve Piferrer 2003). Benzer durum vitellojen sentezinin maksimum olduğu Kasım ve Ocak ayları arasında örneklenen levreklerde olmakta ve bu onun karaciğerinde gözlenen aromataz aktivitesinin varlığını açıklamaktadır (González ve Piferrer 2003).

Aromataz aktivitesi çevresel kontaminantlar ile değişmektedir. Aromataz ekspresyonu bazı dokularda esastır, fakat aromataz ekspresyonu ve aktivitesi steroidler gibi çeşitli hormonlar, sıcaklık ve mevsime bağlı olarak değişebilmektedir (Kitano vd 1999, D’Cotta vd 2001, Kishida ve Callard 2001). Beyin aromatazının eşeyssel dimorfik dağılımı balıkta fizyolojik olaylara ve çevresel düzensizliklere yüksek derecede duyarlıdır. Çevresel kontaminantlar endokrin hedefleri ile etkileşerek eşey tayini ve farklılaşmasını engelleyebilmekte ve üreme başarısını azaltabilmektedir. Her iki yetişkinde veya eşeyssel farklılaşma sırasında endokrin engellenmesi, memelilerde doğurganlığın azalması; yumurtadan çıkan kuşlarda anormal davranışlar, deformasyonlar ve daha kısa yaşama; sürüngenlerde sıcaklık bağımlı eşey tayini ile popülasyon eşey oranlarında değişikliğe ve balıklarda erkeklerin dişileşmesi ile sonuçlanır. Genital papillanın eşeyssel fenotipinin östradiole maruz bırakılan erkeklerde dişi morfolojisine dönüştüğü gösterilmiş, bunun deneylerde kullanılan östradiol

konsantrasyonundan bağımsız, fakat muamele edilen süreye bağımlı olduğu bulunmuştur (Melo ve Ramsdell 2001). Bunun yanı sıra eşey farklılaşmasını etkileyen çevresel faktörler arasında en çok çalışılanı sıcaklıktır. Yüksek sıcaklığın amfibiler, sürüngenler ve balıklar gibi birkaç omurgalıda eşey farklılaşmasını etkilediği gösterilmiştir (Chardard vd 1995, Blázquez vd 1998, Baroiller vd 1999, Pavlidis vd 2000). Ancak genel olarak balıklarda sıcaklık bağımlı eşey belirlenmesi mekanizması bilinmemektedir. Eşey gelişiminin geniş bir şekilde beyin-hipofiz-gonad eksenindeki "feedback kontrol mekanizması" ile kontrol edildiği şeklinde genel bir anlayış vardır (Pavlidis vd 2000). Sürüngenlerde ise eşey steroidlerinin ve aromatazın sıcaklık bağımlı eşey belirlenmesinin temelini açıklamak için kurulmuş 2 teorik model vardır. Birincisinde sıcaklık, androjen-östrojen oranı üzerine etki edebilmekte ve bu 5 $\alpha$ -redüktaz-aromataz aktivitesini etkileyebilmektedir. İkincisinde ise sıcaklık, aromataz geninin transkripsiyonunu etkileyebilmekte ve bu da aromataz enziminin varlığı veya yokluğunu etkileyebilmektedir (Jeyasuria ve Place 1998, Baroiller vd 1999, Pavlidis vd 2000). Yılın çeşitli zamanlarında toplanmış japon balığı beyin dokuları kullanılarak aromataz aktivitesi ölçülmüş, yazın ortalarında spesifik enzim aktivitesinin en düşük olduğu bulunmuştur (Zhao vd 2001).

Omurgalı beyinlerinde aromataz aktivitesi dağılımının korunmuş olduğu görülür, çünkü üreme ve eşey karakterlerini kontrol ettiği bilinen ön beyinde devamlı olarak yüksek konsantrasyonlarda yer almıştır (Balthazart ve Ball 1998). Ayrıca beyin aromatazının, erkek balıkların üreme ile ilgili beyin bölgelerinde dişilerden daha yüksek aktivite göstermesi, bazı kemikli balıkların eşeysel olarak dimorfik olduğunu göstermiştir (Melo ve Ramsdell 2001, González ve Piferrer 2003, Goto-Kazeto vd 2004). Erkeklerin dişilerden daha yüksek aromataz aktivitesi göstermesi dişilerin üreme kapasitesine ulaşmalarının daha uzun zaman almasından dolayı olabilmektedir (González ve Piferrer 2003). Beyin aromatazının nöroanatomik dağılımı üç balık türünde *Porichthys notatus*, *Oncorhynchus mykiss* ve *Danio rerio* (Forlano vd 2001, Menuet vd 2003, Goto-Kazeto vd 2004) immunohistokimya ve *in situ* hibridizasyon ile çalışılmıştır. Biyokimyasal ve mikroanatomik çalışmalar balık beyinde test edilmiş tüm türlerin üreme kontrolüne dahil olan bölgelerinde yüksek aromataz aktivitesinin devamlı olarak saptantığını göstermiştir (Pasmanik ve Callard 1985, Borg vd 1987, Timmers vd 1987, Andersson vd 1988, , Mayer vd 1991). Bundan başka, yıllık üreme

evresi sırasında veya gelişimle ilgili beyin aromataz aktivitesi üzerine veriler balıkta nadirdir. Tatlı su levreği (*Perca fluviatilis*) ve kızılözün (*Rutilus rutilus*) eşeyssel olarak olgunlaşmamış dişilerinde beyin aromataz aktivitesinin, eşeyssel olarak olgunlaşmış dişilerde ölçülenden önemli bir derecede düşük olduğu rapor edilmiştir (Noaksson vd 2001). Japon balığının beyninde yumurtlama sezonunda aromataz aktivitesi en can alıcı noktaya ulaşırken, üremenin inaktif olduğu dönemde ise aromataz aktivitesi seviyesi düşmektedir (González ve Piferrer 2003).

Beyin aromataz aktivitesindeki yaş bağımlı değişiklikler, üreme ile ilgili olduğu bilinen eşey farklılaşması ve ilk olgunluk hali olayları referans noktası olarak kullanılarak belirlenmiştir. Bu nedenle aromataz aktivitesi eşey farklılaşmasının tamamlandığı 1 yıllık gençlerin beyinlerinde ölçülmüş ve ilk kez yumurtlayan yetişkinlerin beyin aromataz aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Her iki durumda da (genç ve yetişkin balık) örnekler aromataz aktivitesini etkileyebilecek olası mevsimsel değişiklikleri elimine etmek için yılın aynı zamanında (Şubat) toplanmıştır. Yetişkinlerde gençlerden 10 kat daha yüksek aromataz aktivitesi gözlenmiştir. Her iki durumda da eşeyler arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir (González ve Piferrer 2003).

Balıklarda beyin aromatazının görevleri; östrojen reseptörlerine çok yakın androjenin östrojene aromatisasyonu, gonadotropin salgılanması, eşeye özel davranışların belirlenmesi, yetişkin eşey karakterinin, ergenliğin başlangıcının ve beyin eşeyssel farklılaşmasının regülasyonu şeklindedir (Melo ve Ramsdell 2001). Bununla beraber, beyin aromataz aktivitesinin regülasyonu ve önemi zayıf bir şekilde anlaşılmıştır. Kemikli balıkların beynindeki yüksek aromataz aktivitesi düzeyleri, düzenleyici yolaklarda önemli bir görev üstlenmekte ve ksenobiyotikler ile endokrin sistemin engellenmesi için potansiyel bir hedef kurmaktadır. Beyin aromataz aktivitesinin karakterizasyonu ve regülasyonu üreme fonksiyonunun kontrol mekanizmasının anlaşılması ve endokrin sistemin engellenmesinin tayin edilmesi için bir araçtır (Melo vd 1999).

Endokrin engelleyiciler, endojen endokrin faktörlere antagonistik veya benzer yollarda organizmaları etkileyen ekzojen kimyasallardır. Bu kimyasalların bazı etkileri, Florida'da yoğun pestisitlerle kirletilmiş Apopka nehriindeki timsahların çarpık cinsiyet

oranları (Semenza vd 1997, Kuhl vd 2005), İngiltere ve Amerika'daki lağım pisliği akıntısına maruz kalmış balıklarda eşey bozukluğu (White vd 1994, Folmar vd 2001, Kuhl vd 2005) ve laboratuarda ksenoöstrojenlere maruz bırakılmış sazan (Kuhl vd 2005) ve medakada (Gronen vd 1999, Kuhl vd 2005) dişileşmiş testisler şeklindedir (Kuhl vd 2005). En çok çalışılmış endokrin engelleyicileri, çevresel östrojenler ve ksenoöstrojenlerdir. Bunlar vücutta östrojene benzeyen bileşenlerdir. Eşey fenotipi, üreme sistemi morfolojisi ve merkezi sinir sisteminin eşeysel farklılaşmasının gelişiminde östrojenlerin öneminden dolayı özellikle kritik gelişim aşamaları sürecinde çevresel östrojenler ve anti-östrojenlere maruziyet, üreyebilme oranında düşme, gonad büyüklüğünde azalma, testis ve yumurtalıkların gelişimi ve tam eşey dönüşümü gibi erkek üreme sisteminde sağlığa zararlı etkilere sebep olabilmektedir (Kuhl vd 2005).

Sonuç olarak, aromataz enzimi yukarıda bahsettiğimiz gibi birçok metabolik ve üreme işlemlerinde merkezi öneminden dolayı fazla dikkat çekmiştir. Beyinde aromataz tarafından östrojenlerin sentezi (nöroöstrojenler), gelişim esnasında eşey farklılaşmasında ve eşeye özel üreme davranışında, dolaşan hormonların organizasyonel ve aktivasyonel etkilerine aracılık ederek kritik bir rol oynar (Melo ve Ramsdell 2001). Yine östrojen hormonunun, meme ve endometrium kanserinin oluşumu ve gelişimi olumsuz yönde etkilemesi kanser araştırmalarından edinilmiş çok önemli bir bilgidir. Dolayısıyla beyin aromataz enziminin karakterizasyonu ve regülasyonu, üreme fonksiyonunun kontrol mekanizmasının anlaşılması ve endokrin sistemin engellenmesinin tayin edilmesi için bir araç oluşturmaktadır. Çeşitli dokularda aromatazın varlığının ortaya konulması, aromatazın karşılaştırmalı endokrinolojisi ve çeşitli türlerin fizyolojisinde aromatazın önemini anlamamıza yardımcı olacaktır. Karsinojenik tümörlerin birçok çeşiti östrojen bağımlıdır ve spesifik aromataz inhibitörleri bu tümörleri inhibe etmek için ilaç endüstrisi tarafından gittikçe artan oranlarda geliştirilmektedir.

## 1.6. Çalışmanın Amacı

Çalışmalarımızda İzmir Pınar balık üretim tesislerinden kolaylıkla temin edebildiğimiz çipura (*Sparus aurata* L., 1758) balıkları kullanılmıştır. Çünkü henüz *Sparua aurata* beyin ve karaciğer aromataz aktivitesi üzerine florometrik bir metodla

herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada, *Sparua aurata* beyin ve karaciğer dibenzilfloresein *O*-debenzilaz (DBFOD) enzimini karşılaştırmalı olarak karakterize etmek amacıyla, yeni bir florometrik substrat olan dibenzilfloresein (DBF) için reaksiyon koşullarının optimize edilmesi, enzim kinetiklerinin tayin edilmesi, DBFOD aktivitesinin beyin ve karaciğer dışında testis, dalak, kalp, böbrek, ince ve kalın bağırsakta bulunup bulunmadığının belirlenmesi ve sonuçta aromataz enziminin DBF ile *in vitro* ölçülebilirliğinin kanıtlanması ayrıca çeşitli olağan bitkisel gıdaların muhtemel inhibitör oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. MATERYAL ve METOT

### 2.1. Materyaller

#### 2.1.1. Deney hayvanı

*Sparus aurata* Vertabrata filumunun Osteichthyes sınıfına aittir. *Sparus aurata*'nın sistematigi ve genel görünüşü Tablo 2.1 ve Şekil 2.1'de verilmiştir.

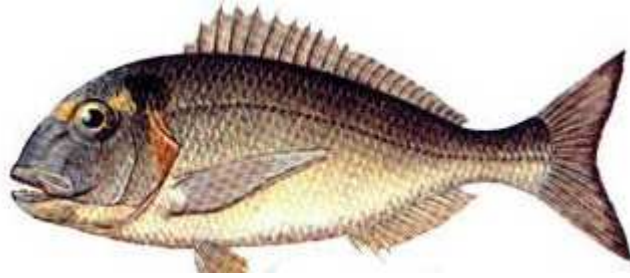
Genellikle tropikal, subtropikal ve ılıman kuşaklarda yayılım gösteren çipura deniz fenogramlarının bulunduğu kumlu-çamurlu ve çamurlu ortamlarda yaşamını sürdürür. Bunun yanı sıra nehir ağzlarına ve lagüner bölgelere de girer (WEB\_2).

**Tablo 2.1** *Sparus aurata*'nın sistematigi.

<b>Süperalem</b>	: Eukaryota
<b>Alem</b>	: Animalia
<b>Filum</b>	: Vertabrata
<b>Altfilum</b>	: Pisces
<b>Sınıf</b>	: Osteichthyes
<b>Takım</b>	: Perciformes
<b>Alttakım</b>	: Percoidei
<b>Aile</b>	: Sparidae
<b>Cins</b>	: Sparus
<b>Tür</b>	: <i>Sparus aurata</i> (Linneaus, 1758)

Ülkemizde daha çok güney sahilleri ve Ege kıyılarında yayılım gösterir. 30–50 gram olanları ince lidaki, 100 gram olanları lidaki, 100–180 gram olanları kaba lidaki, 200 ve üzeri ağırlıkta olanları da çipura olarak adlandırılır. 0–3 yaş arası çipuraların mide içerikleri incelendiğinde bu türün karnivor bir form olduğu ve özellikle ergin bireylerin Crustacea ve Mollusca familyasına ait türlerle beslendiği ortaya çıkmıştır. Sırt yüksekliği fazla olup lateralden yassılaştırmış simetrik bir yapıya sahiptir. Baş iri, burun küt ve ağız terminal konumlu olup düzdür. Üst dudak, alt dudağa oranla daha kalın olup gözün başladığı noktanın paralelinde biter. Gözler orta derecede gelişmiştir.

Göz çukuru önündeki mesafe, göz çapından en az iki kat daha uzundur. Gözler arasında V şeklinde yıldızsı bir bant vardır (WEB\_2).



**Şekil 2.1** *Sparus aurata*.

Operkulum ve prooperkulum pullarla kaplıdır. Yanal çizgi hafif eğimli olarak operkulumdan kaudal yüzgece kadar kesintisiz olarak devam eder. Yanal çizgi üzerinde 73–85 adet pul bulunur. Dorsal yüzgeç anal yüzgeçten daha uzundur. Pektoral yüzgeç anüse kadar uzanır. Kaudal yüzgeç homoserk yapıdadır. Renk dorsalde gri-esmer, ventralde gümüşidir. Pektoral yüzgecin dorsalinde ve operkulum üzerinde kırmızı-menekşe renkli bir leke karakteristiktir (WEB\_2).

Hermafrodit özellik gösteren çipuralar 8. aylarında ovaryum oluşumlarıyla birlikte dişi özellik gösterirler. 12. ayda üremenin ilk sezonunda tüm bireyler erkek karakterdedir. Gonadın ventralinde olgun testiküller belirir. Gonadın dişi kısmında ise hiçbir gelişme gözlenmez. 24. aydaki balıkların ikinci üreme periyodunda ise bireylerde erkeklikten dişiliğe geçiş söz konusudur. Bu dönemde gonadlarda belirgin bir olgunlaşma gözlenmektedir. Bu cinsiyet değişimi ani olmamakla birlikte özellikle 3. yaştaki bireyler intersex özelliğindedir. Ancak bu cinsiyet değişimi populasyonun tamamında değil sadece yaklaşık olarak %80'inde gözlenmektedir ki kalan %20'lik oran populasyonun ve devamının sağlanabilmesi için genetiksel bir emniyet marjı olarak nitelendirilebilir. Bu tip bir cinsiyet değişimine protandrik hermafroditizm adı verilmektedir. Bütün bu değişimlere genetik ve çevresel faktörler ile beslenme özellikleri etki yapmaktadır (WEB\_2).

Çipuraların üreme periyodu ülkemizde Ekim-Aralık ayları arasında olup yaşayabilecekleri sıcaklık aralığı 3–34 °C, tuzluluk değeri ise ‰5–40 olarak belirtilmiştir. ‰1 tuzluluğa kadar yaşayabildikleri Chervinski ve Chanin (1985) tarafından bildirilmiştir. Genellikle 5–25 m arası derinliklerde yayılım gösterirler.

Yaşları ilerledikçe derinlerde yaşamayı tercih ederler. Bunun için dalyan alanlarında ergin bireylere rastlanmaz. Yaz aylarında 0,5–9 m derinliğe kadar olan sığ sulara giriş yapan çipuralar, kış aylarında 35–40 m derinliğe kadar inerler. 2 yaşını aşan bireyler daha da derin sulara inebilmektedirler. Maximum boyları 70 cm'ye ulaşan çipuraların ortalama uzunlukları 25–40 cm arasındadır (WEB\_2).

Çipuraların fizyolojisi ve biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar diğer türlere oranla daha azdır. Laboratuvar şartlarında çalışmaların zorluğu ve çipura balığının kültür koşullarında üretiminin oldukça güç olması bu türle ilgili araştırmaları olumsuz etkilemiştir (Freddi vd 1981, Camus ve Koutsikopoulos 1984, Tandler ve Helps 1985).

### 2.1.2. Kullanılan kimyasallar

Agaroz (A-5093), akrilamit (A-3553), amonyum persülfat (APS; A-3678), 5-bromo-4-kloro-3-indol fosfat (BCIP; B-6149), sığır serum albumin (BSA; A7906), brom fenol mavisi (B-0126), dibenzilflorescein (D7191), etidyum bromid (E8751), etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA; E-5134), florescein (32615), folin reaktifi (F-9252), glisin (G-7126), gliserol (15524), N, N'-metilen bis-akrilamid (BIS; M-7256),  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ( $\beta$ -NADPH; N-7505), kalsiyum klorür-2-hidrat (12022), nitro blue tetrazolyum (NBT; N-6876), fenil metan sülfonil florid (PMSF; P- 7626), sodyum potasyum tartarat (S-2377), tris (T-1378), N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED; T-8133), Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA)'den elde edilmiştir. Bakır sülfat pentahidrat (61240), coomassie pırlanta mavisi R-250 (27816), çinko klorür (96468), N,N-dimetil formamid (40225), Mutlak Etanol (32221), gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (49830), izopropil alkol (24137), katalaz (60630), metanol (34860),  $\beta$ -merkaptotanol (63690), sitokrom c (30400), sodyum karbonat (31432), sodyum klorür (13423), sodyum hidroksit (06203), tris (33742), yumurta albumini (05438), Fluka Chemie (GmbH Industrie Strasse 25 CH-9471 Buchs/Switzerland)'den elde edilmiştir. Asetonitril (1.00030), dietanolamin (DEA; 8.03116), dimetilsülfoksit (DMSO; 2951), hidroklorik asit (1.00314), potasyum monohidrojen fosfat (1.05101), potasyum dihidrojen fosfat (1.04873), sodyum dodesil sülfat (SDS; 13460), Triton X-100 (11869) E. Merck (Darmstadt, Germany)'den elde edilmiştir. Mikro-midi total RNA izolasyon sistemi (12183-018) ve RT-PCR kiti İnvitrogen (Carlsbad, CA 92008 USA)'den elde edilmiştir. Testosteron (Sustanon 250),

süt tozu (Pınar). Kullanılan diğer tüm kimyasallar mümkün olan en yüksek düzeyde analitik saflıkta elde edilmiştir.

## 2.2. Metotlar

### 2.2.1. Canlıların temini

Çalışmalarımızda kullanılan çipura (*Sparus aurata*) balıkları Karaburun Yarımadasına kurulmuş, Çeşme, Ildırı köyü mevkisindeki Pınar balık üretim tesisinden canlı olarak elde edildi. Balıklar 20–24 aylık olup ağırlıkları 250–350 gr arasında değişmekteydi. Canlı olarak yakalanan çipura balıkları buz üstünde sırt kısmından omirilikleri kesilerek öldürüldü. Dokular (beyin, karaciğer, testis, dalak, kalp, böbrek, kalın bağırsak ve ince bağırsak) balıklardan disseksiyon işlemi ile alınarak buz üstüne konuldu ve önce soğuk distile su daha sonra da soğuk fizyolojik serum ile yıkanarak dokuların kanı uzaklaştırıldı. Dokular alüminyum folyo ile sarılıp etiketlenerek sıvı azotta donduruldu. Taze dondurulmuş dokular sıvı azot içerisinde Denizli'deki üniversitemiz laboratuvarına getirildi ve -80 °C Nuãire (Nuãire Ultralow Freezer NU-6382E 2100 Fernbrook lane Ploymouth, MN 55447) derin dondurucuya kaldırıldı.

### 2.2.2. Mikrozomal fraksiyonların hazırlanması

Laboratuarda etiketli alüminyum folyolara sarılı dokular -80 °C derin dondurucudan çıkartılarak hemen buz üzerine alındı. Dokular soğuk distile suda yıkandıktan sonra 5'er gramlık olacak şekilde tartıldı. Bundan sonraki bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Dokular makas ile küçük parçalara ayrıldı. Kıyılan dokulara 3 mM EDTA, 0,3 mM PMSF, 0,15 mM BHT, %10 gliserol, 50 mM potasyum fosfat tamponu (KPi), pH 7,50 ve %0,1 Triton X-100 içeren homojenizasyon çözeltisi doku ağırlığının 3 katı kadar eklenerek buz içine oturtulmuş olan Potter-Elvehjem cam-teflon homojenizatörde homojenizasyon işlemi uygulandı. Homojenizasyon işlemi teflon tokmak cam tüp içinde 10 kez aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600 dönüş yapacak şekilde çevrilerek gerçekleştirildi. Teflon çubuğun döndürülmesi işlemi matkap (Skill 6375 550 watt) kullanılarak yapıldı.

Fraksiyon eldesi çalışmaları bölüm laboratuvarımızda optimize edilmiş olan Shenkman ve Cinti (1978) metoduyla yapılmıştır. Elde edilen homojenat, hücresel kalıntıları uzaklaştırmak üzere Hermle Z323K (220.80.V03 rotor, Hermle Labortechnik

GmbH Gosheimer Str. 56 D-78564 Wehingen, Germany) soğutmalı santrifüj kullanılarak 12000 xg de 25 dakika santrifüj edildi. Süpernatant çift katlı steril sargı bezinden süzülerek peletten ayrıştırıldı. Elde edilen fraksiyonda pelet atıldı, süpernatant ise hacminin 0,5 katı soğuk 0,16 M CaCl<sub>2</sub> eklenmesi ile 20000 xg de 75 dakika santrifüj edildi. Sıvı sitozol kısmı elle homojenize edilip eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak etiketlendi ve -80 °C derin dondurucuda saklandı. Kalan mikrozomal pelet, soğuk homojenizasyon çözeltisi ile yıkanarak 20000 xg de 75 dakika tekrar santrifüj edildi. Çıkan süpernatant dökülerek pelete başlangıç doku ağırlığının 1 katı 50 mM KPi, pH 7,50, 2 mM EDTA, %18 gliserol içeren soğuk süspansiyon tamponu eklendi ve elle homojenize edilip eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak -80 °C derin dondurucuda saklandı.

### 2.2.3. Protein miktar tayini

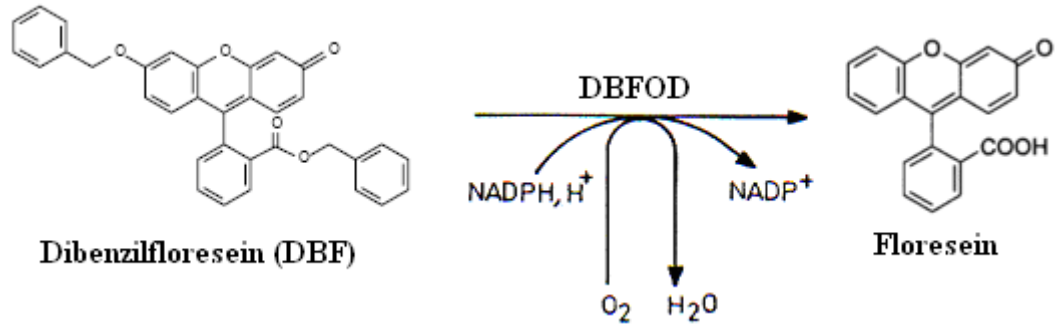
Çipura dokularından elde edilen mikrozomal fraksiyonların protein miktarı tayini, BSA (sığır serum albümin) standart olarak kullanılarak Lowry vd (1951)'e göre yapıldı. 1:200 oranında seyreltilmiş olan mikrozomlar test tüplerine 0,1 ml'den 0,5 ml'ye değişen hacimlerde alındı ve son hacim deiyonize distile su ile 0,5 ml'ye tamamlandı. Sonra %2'lik bakır sülfat, %2'lik sodyum potasyum tartarat ve %2'lik sodyum karbonat içeren 0,1 N NaOH'in 1:1:100 oranında karışmasıyla oluşan 2,5 ml alkali bakır reaktifi ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, deiyonize distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin reaktifinden her bir tüpe 0,25 ml ilave edildi. Folin reaktifini koyar koymaz hemen karıştırıldı ve 50 °C'lik sıcak su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. Oluşan rengin şiddeti her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçüldü.

### 2.2.4. *S. aurata* mikrozomal Dibenzilfloresein *O*-debenzilaz (DBFOD) aktivite tayini

Hazırlanan *S. aurata* mikrozomlarında beyin ve karaciğer dibenzilfloresein *O*-debenzilaz (DBFOD) aktiviteleri DBF substratı kullanılarak florometrik metotla tayin edildi. DBF ve NADPH her çalışmada taze olarak hazırlandı. Standart olarak floresein kullanıldı. 10 ml floresein standardı hazırlamak için 16,6 mg floresein 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü (0,5 mM). Günlük kullanım için  $1 \times 10^3$  kez seyreltildi (0,5  $\mu$ M). Floreseinin eksitasyon ve emisyon spektrumları belirlendi. Bu

metod DBF'in DBFOD tarafından NADPH varlığında floreseine yükseltgenmesi sonucu oluşan sarı rengin 485 nm eksitasyon ve 512 nm emisyon dalga boylarında florometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 2.2).

Eksitasyon ve emisyon spektrum çekimi için, 125 µl 400 mM KPi tamponu pH 7,5, 40 µl 0,5 µM floresein, 335 µl distile su ve 600 µl 1 N NaOH reaksiyon tüpünde karıştırılıp 37 °C sıcaklıkta 2 saat inkübasyonun ardından Cary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) Florometre'de okundu.



**Şekil 2.2** DBFOD aktivitesinin DBF kullanılarak tayini.

Tablo 2.2 ve 2.3'de verildiği gibi tipik reaksiyon ortamı 0,5 ml hacimde belirtilen hacimlerde 100 mM KPi tamponu, 0,2 mM NADPH, mikrozomal protein ve 2 µM DBF kullanılarak hazırlanmıştır.

**Tablo 2.2** Tipik beyin DBFOD aktivite ölçüm karışımının içeriği.

Stok çözeltiler	Eklenen hacim (ml)	Son konsantrasyon
400 mM KPi tamponu, pH 6,50	0,125	100 mM
10 mM NADPH	0,010	0,2 mM
Mikrozomal protein (1mg/ml)	0,020	20 µg
20 µM DBF	0,050	2 µM
Distile su	0,295	-
Toplam	0,5	-

**Tablo 2.3** Tipik karaciğer DBFOD aktivite ölçüm karışımının içeriği.

Stok çözeltiler	Eklenen hacim (ml)	Son konsantrasyon
400 mM KPi tamponu, pH 8,25	0,125	100 mM
10 mM NADPH	0,010	0,2 mM
Mikrozomal protein (1mg/ml)	0,040	40 µg
20 µM DBF	0,050	2 µM
Distile su	0,275	-
Toplam	0,5	-

Tablo 2.2 ve 2.3’de verilen tipik reaksiyon karışımına göre tüplere 100 mM KPi tamponu, 0,2 mM NADPH, mikrozomal protein ve distile su eklenip karıştırıldı ve tüpler 30 °C’de 5 dakika inkübe edildi. Ardından tüplere 2 µM DBF eklenerek 30 °C de, 30 dakika çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyon tüplerine 0,6 mL 1N NaOH eklenerek reaksiyon sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12000  $\times$ g de 15 dakika santrifüj edildi. Sonuçta 1 mL süpernatant yeni tüplere transfer edilerek renk oluşumu için 2 saat 37 °C sıcaklıkta inkübasyonun ardından Cary Eclipse Florometre’de 485 nm eksitasyon ve 512 nm emisyon dalga boylarında köre karşı okundu.

### 2.2.5. DBFOD aktivitesinin *S. aurata* mikrozomlarında karakterizasyonu

*S. aurata* mikrozomlarında beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesinin protein miktarı, pH, sıcaklık, zaman ve substrat (DBF) miktarı ile değişimi incelendi ve optimum değerleri tespit edildi.

#### 2.2.5.1. DBFOD aktivitesi üzerine protein konsantrasyonu etkisi

##### 2.2.5.1.1. Beyin DBFOD aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi

Tablo 2.2’de verilen reaksiyon karışımı 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 ve 300 µg olacak şekilde farklı protein konsantrasyonlarında tekrarlandı ve *S. aurata* mikrozomlarındaki DBFOD aktivitesinin protein miktarı ile etkileşimi tespit edildi.

### **2.2.5.1.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi**

Tablo 2.3'te verilen reaksiyon karışımı 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 ve 300 µg olacak şekilde farklı protein konsantrasyonlarında tekrarlandı ve *S. aurata* mikrozoamlarındaki karaciğer DBFOD aktivitesinin protein miktarı ile etkileşimi tespit edildi.

### **2.2.5.2. DBFOD aktivitesi üzerine pH etkisi**

#### **2.2.5.2.1. Beyin DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi**

Tablo 2.2'de verilen reaksiyon karışımı pH'sı 6,25, 6,50, 6,75, 7,00, 7,25, 7,50, 7,75 ve 8,00 olan 0,4 M KPi tamponu kullanılarak, pH'ın beyin DBFOD aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi.

#### **2.2.5.2.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi**

Tablo 2.3'te verilen reaksiyon karışımı pH'sı 6,50, 6,75, 7,00, 7,25, 7,50, 7,75, 8,00, 8,25 ve 8,50 olan 0,4 M KPi tamponu kullanılarak, pH'ın karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi.

### **2.2.5.3. DBFOD aktivitesi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi**

#### **2.2.5.3.1. Beyin DBFOD aktivitesinin inkübasyon sıcaklığı ile değişimi**

Tablo 2.2'de verilen reaksiyon karışımı 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C gibi on iki farklı sıcaklıkta 30 dak inkübe edilerek sıcaklığın DBFOD aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi.

#### **2.2.5.3.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin inkübasyon sıcaklığı ile değişimi**

Tablo 2.3'te verilen reaksiyon karışımı 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C gibi on iki farklı sıcaklıkta 30 dak inkübe edilerek sıcaklığın DBFOD aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi.



#### **2.2.5.4. DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi**

##### **2.2.5.4.1. Beyin DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi**

Tablo 2.2’de verilen reaksiyon karışımı 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 dakika gibi on farklı zaman süresince 30 °C sıcaklıkta inkübe edilerek DBFOD aktivitesinin zamana karşı değişimi ve ne kadar süre doğrusallık gösterdiği tayin edildi.

##### **2.2.5.4.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi**

Tablo 2.3’te verilen reaksiyon karışımı 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 dakika gibi on farklı zaman süresince 30 °C sıcaklıkta inkübe edilerek DBFOD aktivitesinin zamana karşı değişimi ve ne kadar süre doğrusallık gösterdiği tayin edildi.

#### **2.2.5.5. DBFOD aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi**

##### **2.2.5.5.1. Beyin DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimi**

Tablo 2.2’de verilen reaksiyon karışımı 0,2 ile 3 µM arasında değişen DBF konsantrasyonları kullanılarak inkübe edildi ve DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile doğrusallığı ve substrat doyum kinetiği çalışıldı.

##### **2.2.5.5.2. Karaciğer DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimi**

Tablo 2.3’te verilen reaksiyon karışımı 0,2 ile 2,4 µM arasında değişen DBF konsantrasyonları kullanılarak inkübe edildi ve DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile doğrusallığı ve substrat doyum kinetiği çalışıldı.

#### **2.2.5.6. *Sparus aurata* mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine *in vitro* testosteron etkisi**

Beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine inhibitör etkisi, testosteron kullanılarak çalışıldı.

##### **2.2.5.6.1. Beyin DBFOD aktivitesi üzerine *in vitro* testosteron etkisi tayini**

0,86 M stok testosteron, pH’ı 6,50 olan KPi tamponu ile seyreltilerek günlük çözelti hazırlandı (1,44 µM). Her çalışmada taze olarak hazırlanan çözeltiden son konsantrasyonu 12,5 nM, 25 nM, 37,5 nM ve 50 nM olacak şekilde Tablo 2.2’de

verilen reaksiyon ortamına eklendi ve 5 dak'lık inkübasyon sonrasında substratın ilavesi ile başlayan reaksiyon 0,6 mL 1N NaOH eklenmesiyle sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12000 *xg* de 15 dakika santrifüj edildi. Sonuçta 1 mL süpernatant yeni tüplere transfer edilerek renk oluşumu için 2 saat 37 °C sıcaklıkta inkübasyonun ardından Cary Eclipse Florometre'de 485 nm eksitasyon ve 512 nm emisyon dalga boylarında körlere karşı okundu. Tespit edilen testosteron konsantrasyonlarının 6 farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesi üzerine etkisi çalışıldı ve inhibisyon kinetikleri çıkarıldı.

#### **2.2.5.6.2 Karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine *in vitro* testosteron etkisi tayini**

0,86 M stok testosteron, pH'ı 8,25 olan KPi tamponu ile seyreltilerek günlük çözelti hazırlandı (8,6  $\mu$ M). Her çalışmada taze olarak hazırlanan çözülden son konsantrasyonu 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM ve 200 nM olacak şekilde Tablo 2.3'de verilen reaksiyon ortamına eklendi ve 5 dak'lık inkübasyon sonrasında substratın ilavesi ile başlayan reaksiyon 0,6 mL 1N NaOH eklenmesiyle sona erdirildi. Daha sonra karışım eppendorf tüplerine transfer edilerek 12000 *xg* de 15 dakika santrifüj edildi. Sonuçta 1 mL süpernatant yeni tüplere transfer edilerek renk oluşumu için 2 saat 37 °C sıcaklıkta inkübasyonun ardından Cary Eclipse Florometre'de 485 nm eksitasyon ve 512 nm emisyon dalga boylarında körlere karşı okundu. Tespit edilen testosteron konsantrasyonlarının 6 farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesi üzerine etkisi çalışıldı ve inhibisyon kinetikleri çıkarıldı.

#### **2.2.6. Mikrodalga ekstraksiyonu**

Mikrodalga ekstraksiyon çalışmaları bölüm laboratuvarımızda optimize edilmiş olan Hong vd (2001)'e göre yapılmıştır. Çalışmalarımızda semt pazarlarından ve marketlerden temin edilen olağan bitkisel gıdalar (nane, *Mentha piperita*; tere, *Lepidium sativum*; karalahana, *Brassica oleraceae acephala*; dut, *Morus alba*; kazayağı, *Chenopodium sp.*; ısırgan, *Urtica dioica*; oğulotu, *Melisa officinalis*; afyon, *Papaver somniferum*; gelincik, *Papaver rhoeas*; enginar, *Cynara scolymus*; pancar, *Beta vulgaris*; defne, *Laurus nobilis*; dereotu, *Anethum graveolens*; roka, *Emca sativa*; karahindiba, *Taraxacum sp.*; maydanoz, *Petroselinum crispum*; pazı, *Beta vulgaris var. cicla*; acı sarmaşık, *Tamus communis*; tatlı sarmaşık, *Asparagus acutifolius*; sumak, *Rhus coriaria*; fesleğen, *Ocimum basilicum*; kuzu kulağı, *Rumex sp.*; safran, *Crocus*

*sativus*; kekik, *Thymus vulgaris*; ebegümece, *Malva sylvestris*; pırasa, *Allium porrum*; biberiye, *Rosmarinus officinalis*; ıspanak, *Spinacia oleracea*; susam, *Sesamum indicum*; kereviz, *Vitex agnus*) kullanılmıştır. Gıdalar 40–45 °C sıcaklıkta pasteur fırınında (BINDER) kontrollü olarak kurutuldu. Kurutulan gıdalar mutfak robotuyla (Woulinex-FP185) öğütüldü. 0,5 gr parçalanmış gıda 50 ml’lik erlende üzerine 2 ml metanol ve 8 ml distile su eklendikten sonra çalkalandı ve mikrodalga fırınının (SHOV-M7017P-A) düşük gücünde 1 dak tutuldu ve aşırı kaynamayı önlemek için hemen çalkalanarak buz üzerine 1 dak soğuması beklendi. Bu işlem her gıda için 5 kez tekrarlandı. Ekstraktlar 125 mm’lik Whatman #1 (Schleicher & Schuell) filtre kâğıdından süzüldü ve eppendorf tüplerine transfer edilerek 12000 xg de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatanttan 50 µl Tablo 2.2 ve 2.3’te verilen reaksiyon ortamına eklendi ve 5 dak’lık bir ön inkübasyon sonrasında Bölüm 2.2.4’te tanımlandığı gibi DBFOD aktivitesi ölçülerek olağan bitkisel gıdaların mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkisi çalışıldı.

### **2.2.7. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAJE)**

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. sığır sütü  $\alpha$ -laktalbumini ( $M_r$  14,200), soya fasulyesi tripsin inhibitörü ( $M_r$  20,100), sığır pankreas tripsinojeni ( $M_r$  24,000), sığır karbonik anhidrazi ( $M_r$  29,000), tavşan kası gliseraldehit–3-fosfat dehidrojenazi ( $M_r$  36,000), yumurta albumini ( $M_r$  45,000) ve sığır albumini ( $M_r$  66,000) moleküler ağırlık standartları olarak kullanılmıştır. SDS-PAJE’in detayları aşağıda verilmiştir.

#### **2.2.7.1. Stok çözeltiler**

##### **2.2.7.1.1. 10X elektrot tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, pH 8,30)**

30 g Tris ve 144 g glisin distile suda çözüldü ve son hacim 1 lt’ye tamamlandı. Tamponun pH’sı asit veya bazla ayarlanmadı. Tampon kullanımdan önce 1 lt tampona 1 g SDS eklenerek 10 kez sulandırılarak kullanıldı.

### 2.2.7.1.2. Stok ayırıştırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,80)

18,15 g Tris yaklaşık 60 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 8,8'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 2.2.7.1.3. Stok sıkıştırma jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,80)

6 g Tris yaklaşık 40 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 6,8'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 2.2.7.1.4. Stok jel çözeltilisi (Akrilamid-BIS, %30 T, %2,67 C)

29,2 g akrilamid bir miktar distile suda çözüldü; 0,8 g BIS (Bis-akrilamid) eklendi ve çözeltili distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra çözeltili kaba filtre kâğıdından süzüldü. %T toplam akrilamid monomer konsantrasyonunun yüzdesini gösterir ve %C aşağıda gösterildiği gibi çapraz bağlanan monomer konsantrasyonunu tanımlar.

$$\%T = (g \text{ Akrilamid} + g \text{ BIS} / \text{toplam hacim}) \times 100$$

$$\%C = (g \text{ BIS} / g \text{ Akrilamid} + g \text{ BIS}) \times 100$$

### 2.2.7.1.5. %10 SDS

10 g SDS ısıtılarak distile suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

### 2.2.7.1.6. %10 Amonyum persülfat (APS)

0,1 g amonyum persülfat 1 ml distile suda çözüldü. Her seferinde taze olarak hazırlandı.

### 2.2.7.1.7. 4X numune seyreltme tamponu

%8 SDS, %40 gliserin, %20  $\beta$ -merkaptöetanol ve %0,01 bromfenol mavisi içeren 0,25 M Tris-HCl (pH 6,80) Tablo 2.4'te verilen çözeltilerin belirtilen hacimlerde karıştırılması ile hazırlandı. Tamponun pH'sı son hacime tamamlanmadan önce 1 M HCl ile 6,80'e titre edildi.

**Tablo 2.4** 4X numune sulandırma tamponunun içeriği

Stok çözeltiler	Eklenen Hacim (ml)
1 M Tris-HCl (pH 6,80)	2,5
Gliserin	4,0
B-merkaptoetanol	2,0
SDS	0,8 g
Bromfenol mavisi	1,0 mg
Toplam Hacim	10

**2.2.7.1.8. Stok moleküler ağırlık standart çözeltileri**

Moleküler ağırlık standart proteinlerini içeren SDS7 (sığır sütü  $\alpha$ -laktalbumini, soya fasülyesi tripsin inhibitörü, sığır pankreas tripsinojeni, sığır karbonik anhidrazı, tavşan kası gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazı, yumurta albumini ve sığır albumini) kendi şişesinde 0,4 ml 4X numune sulandırma tamponu ve 1,2 ml steril ultra saf su içinde 10 saniye karıştırılarak çözüldü. Stok çözelti eppendorf tüplere 50  $\mu$ l olacak şekilde dağıtıldı ve -20 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

**2.2.7.1.9. Jel polimerizasyon çözeltilerinin hazırlanması**

Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.5’de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlandı.

**Tablo 2.5** SDS-PAJE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.

İçerik	Ayrıştırıcı Jel (%8,5) (0,375 M Tris, pH 8,80)	Sıkıştırıcı Jel (%4) (0,125 M Tris, pH 6,80)
Jel Çözeltisi(ml)	8,5	1,5
Distile Su (ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,012
<b>Toplam Hacim</b>	<b>30</b>	<b>10</b>

## 2.2.7.2. Prosedür

### 2.2.7.2.1. Jelin hazırlanması

Poliakrilamid slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile The Emperor Penguin Water Cooled Dual Gel Electrophoresis System Model P9DS (Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, NH USA) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk önce jel sandviçi temiz ve düz bir zemin üzerinde önce uzun camın (14 x 16 cm), bunun üzerine 0,8 mm'lik teflon ayırıcılar ile sabitleyici plastik levhanın ve son olarak kısa camın (12,5 x 16 cm) üst üste yerleştirilmesiyle oluşturuldu. Bunu, sandviçin sisteme oturtularak vidalarla sıkıştırılması ve sandviçin oturtulduğu tabandaki kuyucuğa %2'lik agaroz dökülerek sisteme sabitlenmesi izledi. Daha sonra ayrıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu Tablo 2.5'de belirtilen oranlarda hazırlanarak sandviç içindeki çözeltinin istenilen yüksekliğe (8–9 cm) ulaşmaya kadar 10 ml'lik bir pipet yardımı ile teflon ayırıcıların bir köşesinden jel sandviçin içine doğru transfer edildi. Ucu bükülmüş iğneli bir şırınga kullanılarak, düz bir jel yüzey oluşumunu sağlamak için nazıkçe boşlukların bir köşesinden fışkırtılmak suretiyle jel polimerizasyon solüsyonunun yüzeyi yaklaşık 0,1 cm kalınlığında bir izopropil alkol tabakasıyla kaplandı. Jel sonradan oda sıcaklığında 15–20 dak süreyle polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyondan sonra alkol tabakası tamamen boşaltıldı ve hazırlanan sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu 5 ml'lik pipet kullanılarak sandviç tamamen dolana kadar bir teflon ayırıcının köşesinden jel sandviçinin içine döküldü. Sıkıştırıcı jel eklendikten sonra 15 tane diş içeren 0,8 mm'lik teflon tarak, tarağın dişi içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu katmanına yerleştirildi. Polimerizasyon oda sıcaklığında yaklaşık 30 dak'da tamamlandı.

### 2.2.7.2.2. Örneğin ve moleküler ağırlık standartlarının hazırlanması

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için *Sparus aurata* beyin, karaciğer, testis, kalp, dalak, böbrek, ince bağırsak ve kalın bağırsak mikrozomları kullanıldı. Analiz edilecek proteinlerden alınan bir örnek 4X numune seyreltme tamponu ile 3:1 oranında (3 kısım örnek ve 1 kısım tampon) seyreltildi ve sıcak su banyosunda 2 dakika süre ile kaynar suda kaynatıldı. Kullanılan SDS7 moleküler ağırlık standardı da 2 dak süreyle sıcak su banyosunda kaynatıldı.

### 2.2.7.2.3. Örneklerin yüklenmesi

Teflon tarak dişleri yırtmadan dikkatlice sıkıştırıcı jelden çıkarıldı. Kuyucuklar eğer varsa herhangi bir hava kabarcığını uzaklaştırmak için ince iğneye sahip bir şırınga kullanılarak elektrot tamponu ile dolduruldu. Daha sonra blok alt ve üst rezervuarları elektrot tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi.

Uygun iğneli bir Hamilton şırıngası kullanılarak 20 µl (120 µg *Sparus aurata* beyin, karaciğer, testis, kalp, dalak, böbrek, ince bağırsak ve kalın bağırsak mikrozomlarından) protein örneklerinden ve 10 µl moleküler ağırlık standartlarından kuyucukların tabanında ince bir katman olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

### 2.2.7.2.4. Elektroforetik ayrıştırma

Sistem Thermo EC 1000–90 (100 Colin Drive Holbrook, NY 11741–4306, USA) güç kaynağına bağlandı. Sisteme aynı anda iki jel sandviçi hazırlanarak aynı anda iki elektroforetik ayrıştırma yapıldı. Elektroforetik ayrıştırmanın yapılacağı iki jel için sıkıştırıcı jel üzerinde 20 mA'lık sabit akım yürütme işlemi yapıldı. Yol gösterici boya ayrıştırıcı jele ulaştığında akım 30 mA'e sıkıştırıcı jelden çıktığında ise 40 mA'e ayarlanmasına yardımcı olur.

### 2.2.7.2.5. "iBlot" kuru transfer sistemi

Proteinlerin jelden membrana transfer işleminde "iBlot" kuru transfer sistemi kullanıldı. Kontaminasyonlardan kaçınmak için eldiven giyildi. Üzerinde kendi membranı olan anot (pozitif elektrot), plastik küveti ile beraber cihaza yerleştirildi. Jel 1 nolu kuyucuğu gösteren çentik sağda kalacak şekilde membranın üzerine dikkatlice yerleştirildi. Jelin üzerine, ultra saf su ile ıslatılıp süzülükten sonra sistemin kendi filtre kâğıdı yerleştirildi. Olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla üzerinden ultra saf su ile ıslattığımız roller ile geçildi. Katot (negatif elektrot), plastik küvetinden çıkarılıp filtre kâğıdının üzerine yerleştirildi ve tekrar üzerinden kuru roller ile geçildi. Sistemin sünger üst kapağa yerleştirildi. Kapak kapatılıp, sistem P3 (20 V) 7 dakikaya ayarlandı ve transfer gerçekleştirildi. Sistemin soğuması için 5 dakika bekledikten sonra P3 (20 V) 7 dakika süresince transfer tekrarlandı. Süre sonunda sistemin kapağı açıldı ve üstteki katot ve filtre kâğıdı dikkatlice yumuşak uçlu forseple alındı.

### 2.2.7.2.6. Proteinlerin immünokimyasal tespiti

Transferin ne derecede gerçekleştiğini tespit etmek için jel 45 dak süreyle %0,2 Coomassie Pırlanta Mavisi R 250, %50 metanol ve %12 glasiyal asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak boyandı ve sabitlendi. Uygun bir süre (en azından 24 saat) bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jelden membrana transfer olamayan protein miktarı tespit edilmeye çalışıldı. Üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot', protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi ve membran 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde %5'lik yağsız süt tozu) ile çalkalayıcı da inkübe edildi.

Süre sonunda 40 ml bloke çözeltisi içinde 100 µl çözülerek hazırlanan primer antikorlar (anti-Rat CYP19-IgG), membranın üzerine boşaltıldı ve 2 saat inkübe edildi. Daha sonra membran TBST solüsyonunda her biri 5 dak olmak üzere 3 defa yıkandı. Yıkama çözeltisi, membranın tamamen temizlenmesini sağlamak için yapılan her yıkama basamağı arasında plastik tepside tamamen uzaklaştırıldı. Membran daha sonra 1 saat süreyle işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbit IgG-ALP konjugatı) ile bağı olan ikinci antikorlarla inkübe edildi. Membran önceden tarif edildiği gibi yıkandı. Sonuç olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından Tablo 2.6'da verilen substrat çözeltisi ile inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra membran havada kurutuldu, stretch film ile kaplandı ve karanlıkta saklandı. Substrat çözeltisi her seferinde taze olarak hazırlandı ve kullanımdan sonra atıldı.



**Tablo 2.6** Nitroselüloz membran üzerinde transfer edilen proteinlerin immünolojik tayini için substrat çözeltisi hazırlama.

<p><b>Çözelti A:</b></p> <p>1,5 M Tris-HCl, pH 8,80 2,97 ml</p> <p>1 M NaCl 4,0 ml</p> <p>100 mM MgCl<sub>2</sub> 0,82 ml</p> <p>100 mM ZnCl<sub>2</sub> 0,04 ml</p> <p>DEA 0,096 ml</p> <p>NBT 12,2 mg</p> <p>Son hacim 40 ml</p>
<p><b>Çözelti B:</b> Distile suda 2 mg/ml fenazin metasülfat</p>
<p><b>Çözelti C:</b> 5,44 mg BCIP/0,136 ml N, N-dimetil formamid</p>
<p>Sonuç olarak, NBT/BCIP substrat çözeltisi A çözeltisi ile C çözeltisi ve 0,268 ml B çözeltisinin karışımından hazırlandı.</p>

- A çözeltisinin pH'sı, son hacmine tamamlanmadan önce satüre Tris ile 9,55'e ayarlandı.

### 2.2.8. *Sparus aurata* beyin dokusundan total RNA izolasyonu

*Sparus aurata* beyin dokusundan total RNA izolasyonu için mikro-midi total RNA izolasyon sistemi kullanıldı. Steril ortamda öğütülmüş dokunun konulacağı eppendorf tartılarak darası alındı ve spatül ve makasla birlikte sıvı azotta bekletildi. Bir gün öncesinden otoklavlanmış ve soğuması için -80 °C derin dondurucuya kaldırılmış olan havan ve havaneli çıkarıldı. Soğukluğunu muhafaza etmesi için içine bir miktar sıvı azot dökülüp buharlaştırıldı. -80 °C'deki doku havana alındı ve üzerine yumuşamaması için sıvı azot dökülerek havaneli ile iyice öğütüldü. Öğütülen dokunun 50 mg'ı RNaz içermeyen 2 ml'lik yuvarlak tabanlı mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Üzerine 600 µl doku parçalama I çözeltisi, homojenizasyon için %1'lik olacak şekilde 6 µl 2-merkaptöetanol ilave edilerek 18G uçlu steril iğne ile 10 defa çekip bırakılarak doku homojenize edildi. 12000 *xg*'de 2 dakika 14 saniye santrifüj edildi. Oluşan Sup veya santrifugat pelete dokunmadan yeni steril eppendorfa alındı. Supa 600 µl %70'lik etanol eklendi ve 45 saniye karıştırılarak pellet oluşumları çözüldü. Bu noktada pellet

kalmaması önem arz etmektedir. Kit içerisinde bulunan Spin kartuş tüpüne suptan 600 µl koyuldu ve 12000 *xg*'de 29 saniye santrifüj edildi. Spin kartuş yeni eppendorfa alındı ve supun kalan kısmı (600 µl) Spin kartuşa transfer edildikten sonra tekrar 12000 *xg*'de 29 saniye santrifüj edildi. Spin kartuş tekrar yeni eppendorfa alındı. Olası bir kontaminasyonu önlemek amacıyla Spin kartuşa önce 350 µl Yıkama Solüsyonu I eklenip 12000 *xg*'de 29 saniye santrifüj edildi sonra DNaz I Karışımından (3 µl DNaz I + 8 µl DNaz I tamponu + 69 µl ultra saf su) 80 µl Spin kartuşa eklendikten sonra oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 350 µl Yıkama Solüsyonu I eklendi ve 12000 *xg*'de 29 saniye santrifüj edildi. Spin kartuş yeni eppendorfa alınarak 350 µl Yıkama Solüsyonu II eklendi ve 12000 *xg*'de 29 saniye santrifüj edildi. Spin kartuş, kit içerisinde bulunan yıkama tüpüne alınarak 500 µl Yıkama Solüsyonu II eklendi ve 12000 *xg*'de 29 saniye santrifüj edildi. Aynı yıkama tüpüne tekrar 500 µl Yıkama Solüsyonu II eklendi ve 12000 *xg*'de 29 saniye santrifüj edildi. Daha sonra 12000 *xg*'de 1 dakika 14 saniye santrifüj edildikten sonra Spin kartuş, kit içerisinde bulunan geri alma tüpüne konuldu. Kitin içerisinde bulunan RNaz içermeyen sudan 60 µl dikkatlice membranın ortasına eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 12000 *xg*'de 2 dakika 14 saniye santrifüj edildi. Sonuç olarak, 50 mg beyin dokusundan 60 µl total RNA izole edilmiş oldu. Elde etmiş olduğumuz RNA solüsyonu -20 °C'de muhafaza edildi.

### **2.2.9. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)**

RNA molekülü, PCR ile çoğaltılmadan önce ters transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA (tamamlayıcı DNA)'ya çevrilmiş, ardından cDNA, spesifik primerlerle PCR tekniği ile çoğaltılmıştır (RT-PCR). Elimizde bulunan kit prosedürü gereğince birbiri ardına gelen döngü şartları, Gene Amp® PCR System 9600 ve 2400 ve DNA Engine® sistemi kullanılarak test edilip onaylanmıştır. Belirlenmiş bu kurallar *Technne TC 512* termal döngü cihazına uygulanmıştır. Tablo 2.7'de verilen reaksiyon karışımı PCR tüpünde buz üzerinde hazırlanıp 2 saniye santrifüjde döndürülmüştür. Ardından tüpler cihaza yerleştirilip reaksiyon başlatılmıştır.

**Tablo 2.7** RT-PCR karışımının içeriği.

<b>Bileşenler</b>	<b>Hacim (µl)</b>
2X reaksiyon karışımı	25
Tamamlayıcı RNA (2 µg)	4
İleri Primer (CYP19A1F) (10 µM) <b>5' GCT TCT CAT CGC AGA GTA TCC GG 3'</b>	1
Geri Primer (CYP19A1R) (10 µM) <b>5' CAA GGG TAA ATT CAT TGG GCT TGG 3'</b>	1
SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Kar*	2
Otoklavlanmış Ultra Saf Su	17

Etkili cDNA sentezi, 30 dakika 55 °C başlangıç derecesinin ardından 45–60 °C'de 15–30 dakika inkübasyonla gerçekleştirilmiştir. PCR döngüsü üç basamaktan (denatürasyon, bağlanma, uzama) oluşmaktadır. cDNA sentezi 55 °C'de 30 dakika içerisinde ters transkriptaz enzimiyle gerçekleştirildikten sonra 2 dakika boyunca 94 °C'de ilk denatürasyon gerçekleşmiş, bu basamakta mRNA ve cDNA zincirleri birbirlerinden ayrılmışlardır (Şekil 2.3). Sonra 40 döngülük 94 °C'de 15 saniye denatürasyon, 55 °C'de 1 dakika primerlerin DNA'lara bağlanması ve 68 °C'de 1 dakika zincir sentezi basamakları gerçekleştirilmiştir. Son olarak bir döngülük 68 °C'de 5 dakika zincirlerin kopyalanması basamağı gerçekleştirilmiştir. PCR ürününün 10 µl'si %1,5'lik agaroz jelde yürütülüp UV ışığı altında etidyum bromid boyamayla görüntülenmiştir.

### 2.3. İstatistiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar her bir veri noktası için Ortalama ± Standart Sapma olarak ifade edilmiştir.

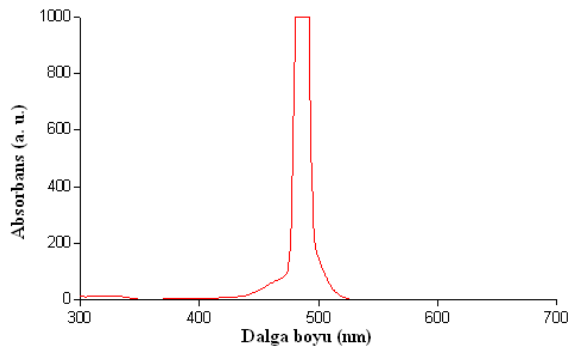
### 3. BULGULAR

#### 3.1 *Sparus aurata* Mikrozomal Fraksiyonlarında Protein Tayini

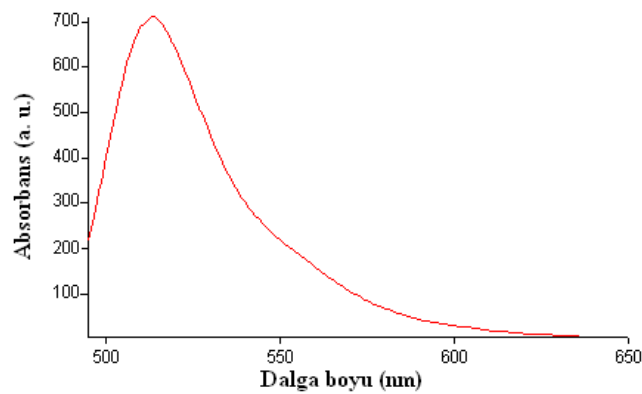
Mikrozomal fraksiyonlarının protein miktarlarını hesaplamak için 0'dan 200 mg BSA'ya kadar olan standart BSA eğrisi kullanıldı.

#### 3.2 *Sparus aurata* Mikrozomal DBFOD Aktivitesinin Tayini

DBFOD aktivitesi *Sparus aurata* beyin ve karaciğer mikrozomlarında Dibenzilfloresein (DBF) substratı kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar tespit edildi. Floresein standardının eksitasyon ve emisyon spektrumları Şekil 3.1 ve 3.2'de verilmiştir. DBFOD aktivitesi florometrik olarak eksitasyon 485 nm ve emisyon 512 nm'de DBF substratı kullanılarak tayin edildi.



Şekil 3.1 Floreseinin eksitasyon spektrumu.



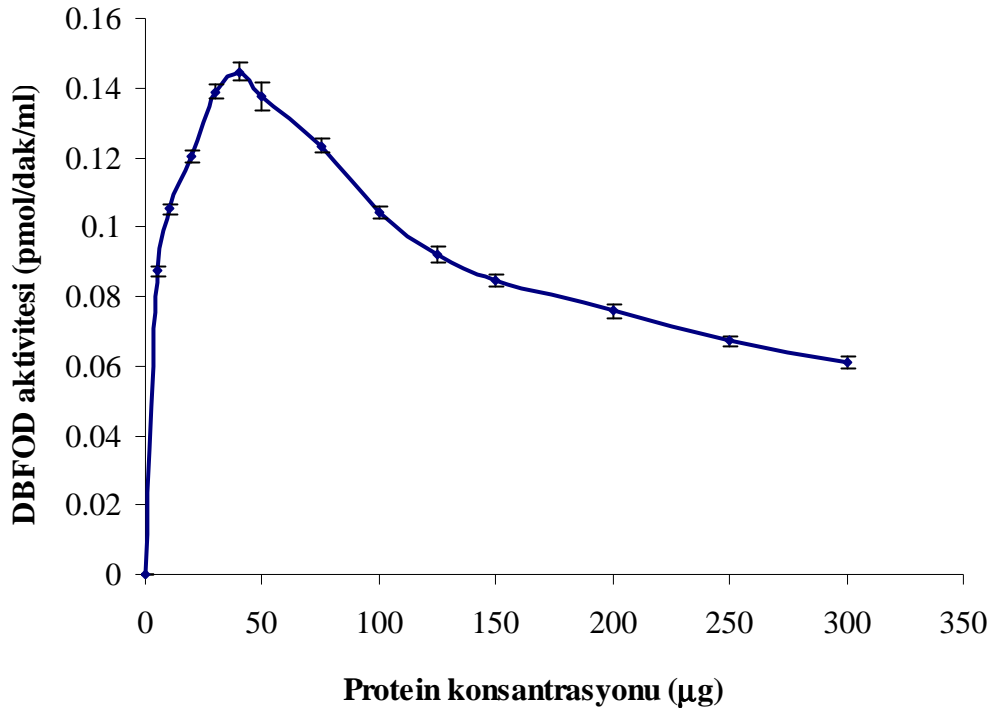
Şekil 3.2 Floreseinin emisyon spektrumu.

### 3.3 DBFOD Aktivitesinin *Sparus aurata* Mikrozomlarında Karakterizasyonu

#### 3.3.1. *Sparus aurata* mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

##### 3.3.1.1 Beyin DBFOD aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi farklı mikrozomal protein konsantrasyonlarında DBFOD aktivitesinin değişimi incelendi. Bizim ölçemediğimiz bazal bir floresein mevcut olduğundan aktivitede doğrusal bir artış gözlenmedi. Kısmi doğrusallık 20 µg'a kadar devam etti. Rutin aktivite ölçümlerinde 20 µg protein konsantrasyonu kullanıldı. Enzim aktivitesinin protein konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 3.3'de verilmiştir.

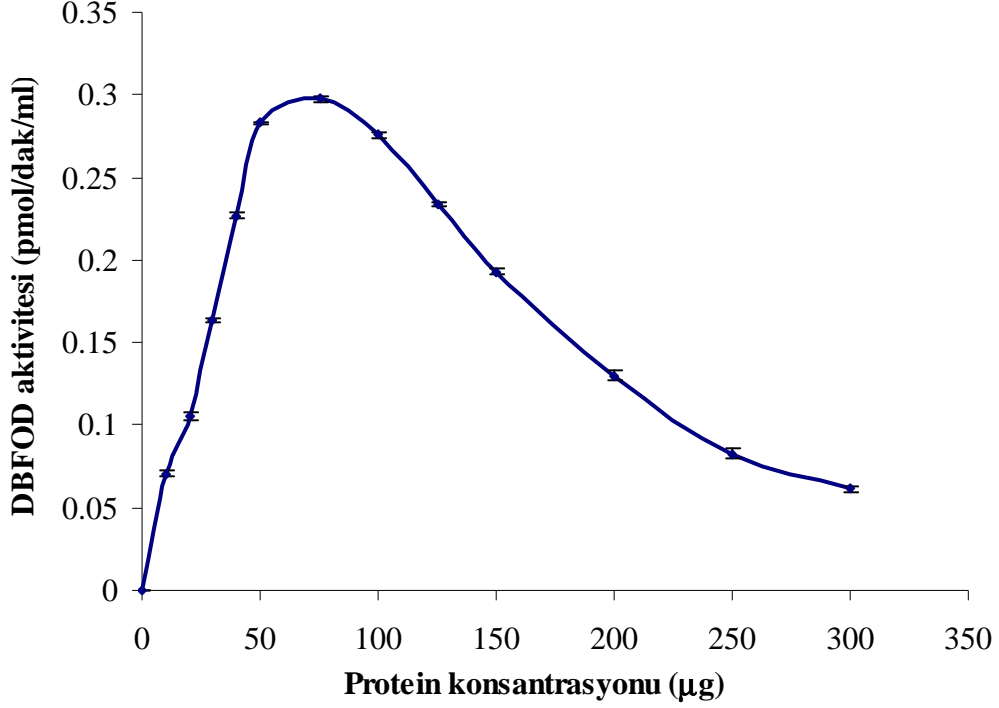


**Şekil 3.3** Protein konsantrasyonunun *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine etkisi. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

##### 3.3.1.2 Karaciğer DBFOD aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi farklı mikrozomal protein konsantrasyonlarında DBFOD aktivitesinin değişimi DBF substratı kullanılarak incelendi. Aktivite 40 µg protein miktarına kadar doğrusal bir artış gösterdi. Bundan

sonra kısmi doğrusallık 50  $\mu\text{g}$ 'a kadar devam etti. Ancak plato gözlenmedi. Rutin aktivite ölçümlerinde 40  $\mu\text{g}$  protein konsantrasyonu kullanıldı. Enzim aktivitesinin protein konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 3.4'te verilmiştir.

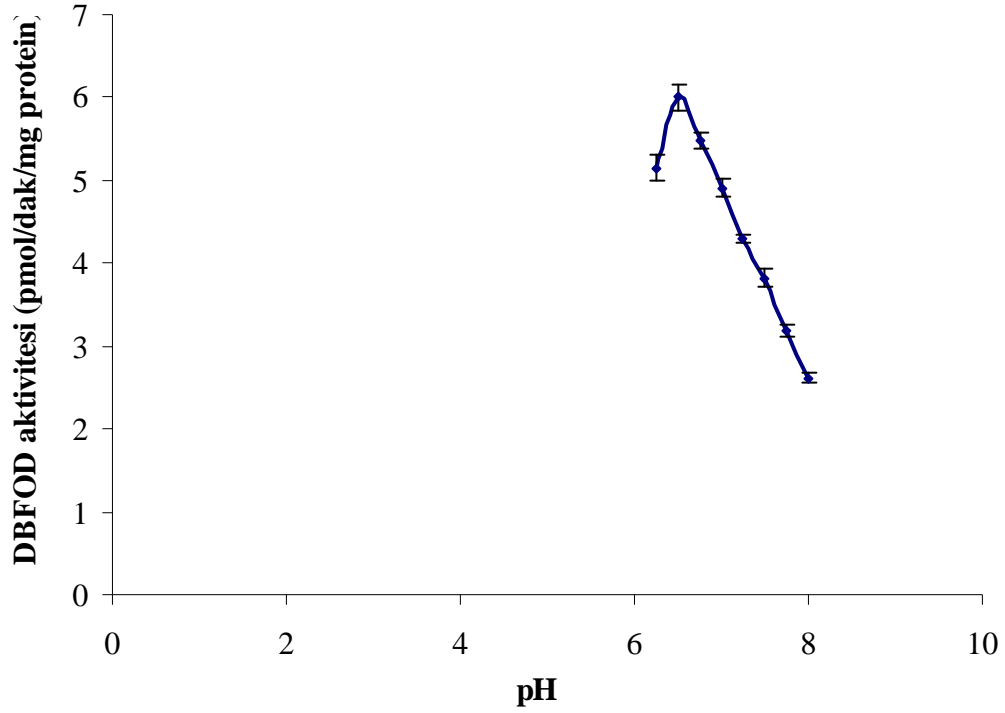


**Şekil 3.4** Protein konsantrasyonunun *Sparus aurata* mikrozoal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkisi. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.3.2 *Sparus aurata* mikrozoal DBFOD aktivitesi üzerine pH etkisinin tayini

#### 3.3.2.1 Beyin DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi

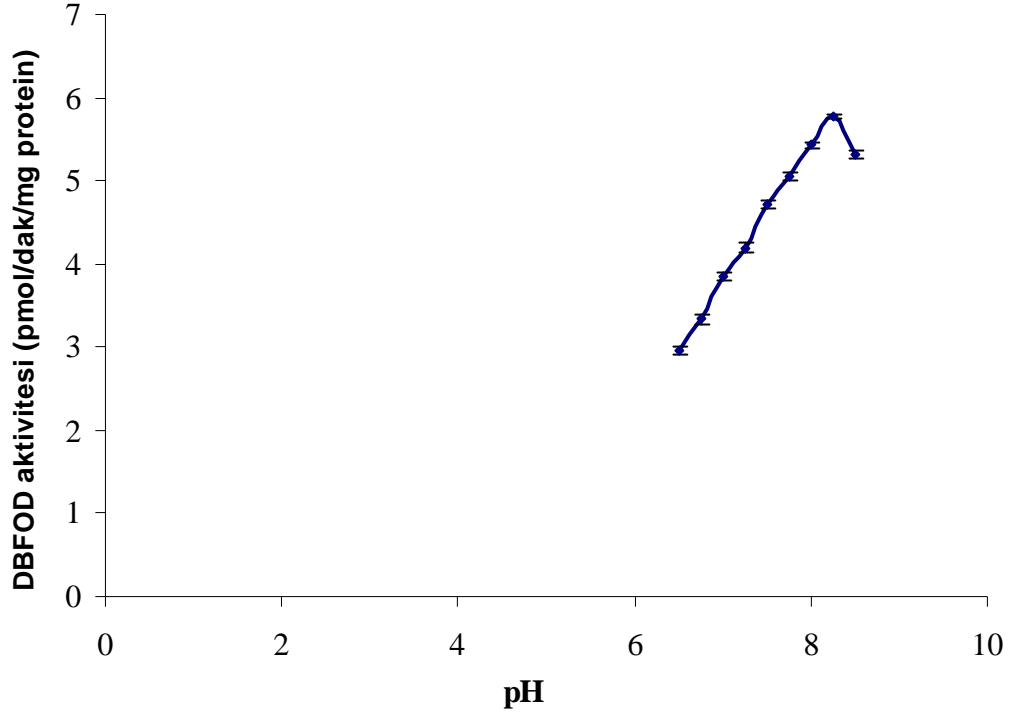
pH 6,25–8,00 aralığında potasyum fosfat tamponu (KPi) kullanılarak pH'ın beyin DBFOD aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi. Maksimum aktivite pH 6,50'de tespit edildi. Şekil 3.5'de beyin DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi gösterilmiştir.



**Şekil 3.5** pH'ın *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine etkisi. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.3.2.2 Karaciğer DBFOD aktivitesinin pH ile değişimi

pH 6,50–8,50 aralığında fosfat tamponu (KPi) kullanılarak pH'ın karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi. Maksimum aktivite pH 8,25'de tespit edildi. Enzim aktivitesi üzerine pH etkisi Şekil 3.6'da verilmiştir.



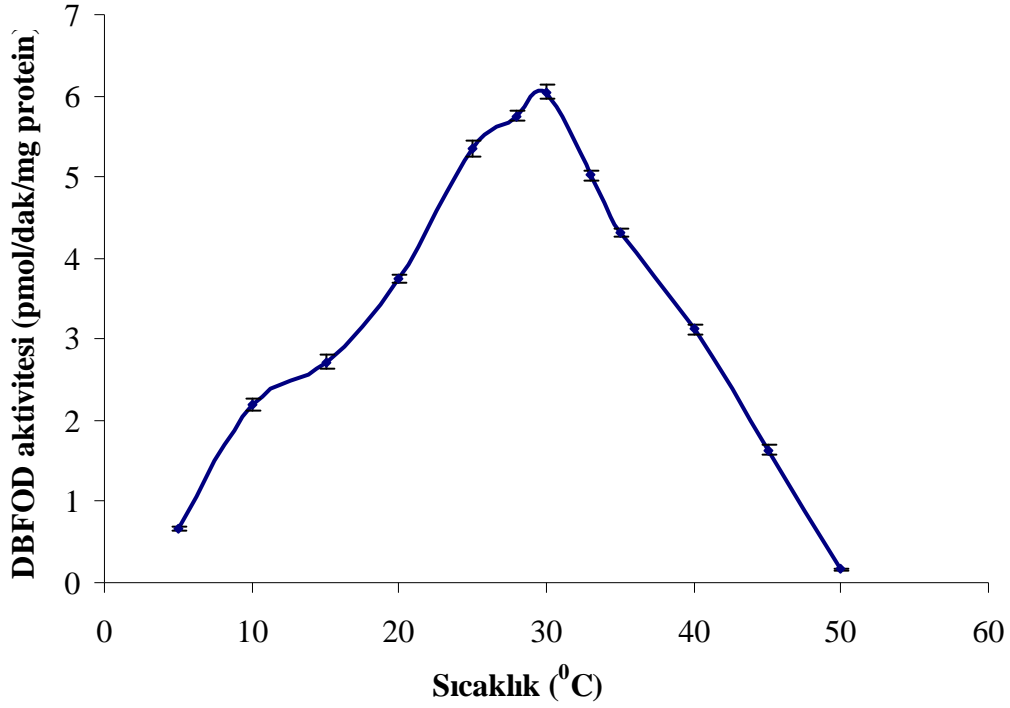
**Şekil 3.6** pH'ın *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkisi. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.3.3 *Sparus aurata* mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi tayini

#### 3.3.3.1 Beyin DBFOD aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

*Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi değişimleri materyal ve metotta tanımlanan on iki farklı reaksiyon sıcaklığında (5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C) tayin edildi. Maksimum aktivite 30 °C sıcaklıkta tespit edildi. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi Şekil 3.7'de verilmiştir.

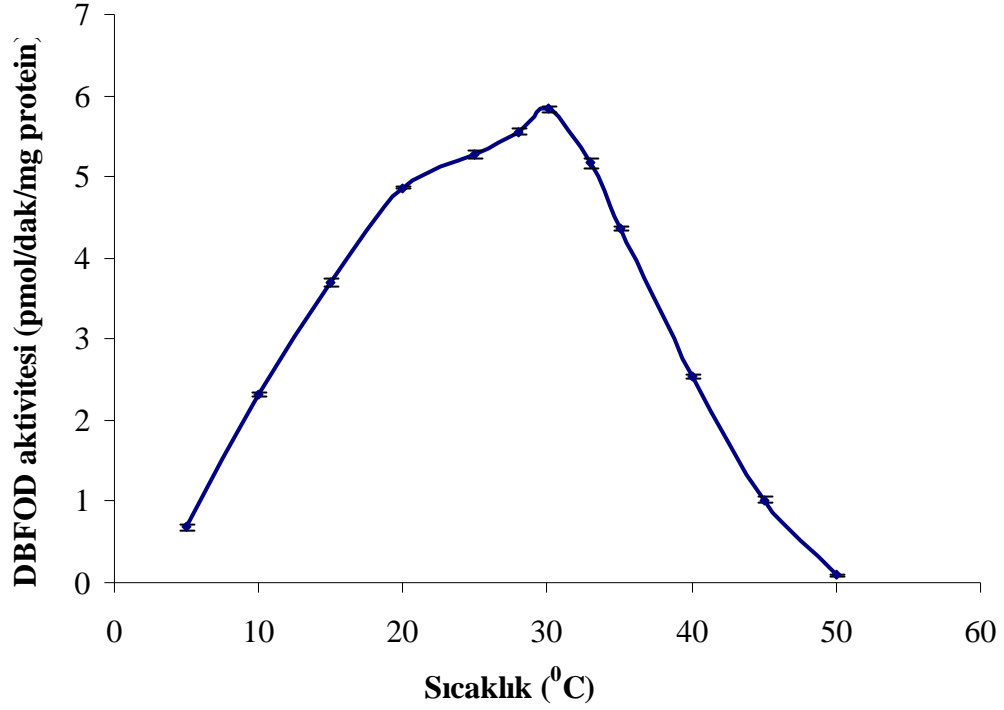




**Şekil 3.7** Sıcaklığın *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine etkisi. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.3.3.2 Karaciğer DBFOD aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

*Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi değişimleri materyal ve metotta tanımlanan on iki farklı reaksiyon sıcaklığında (5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C ve 50 °C) tayin edildi. Maksimum aktivite 30 °C sıcaklıkta tespit edildi. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi Şekil 3.8’de verilmiştir.

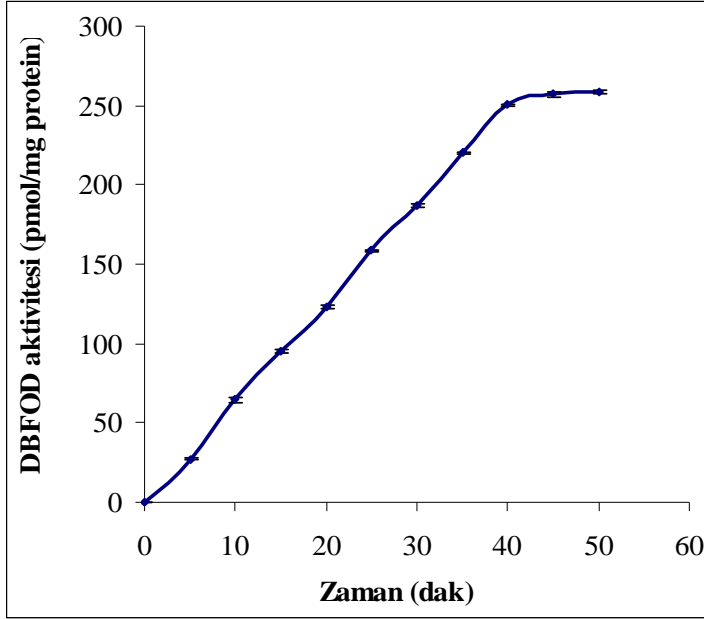


**Şekil 3.8** Sıcaklığın *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkisi. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.3.4 *Sparus aurata* mikrozomal DBFOD aktivitesinin zamana karşı değişimi

#### 3.3.4.1 Beyin DBFOD aktivitesinin zamana karşı değişimi

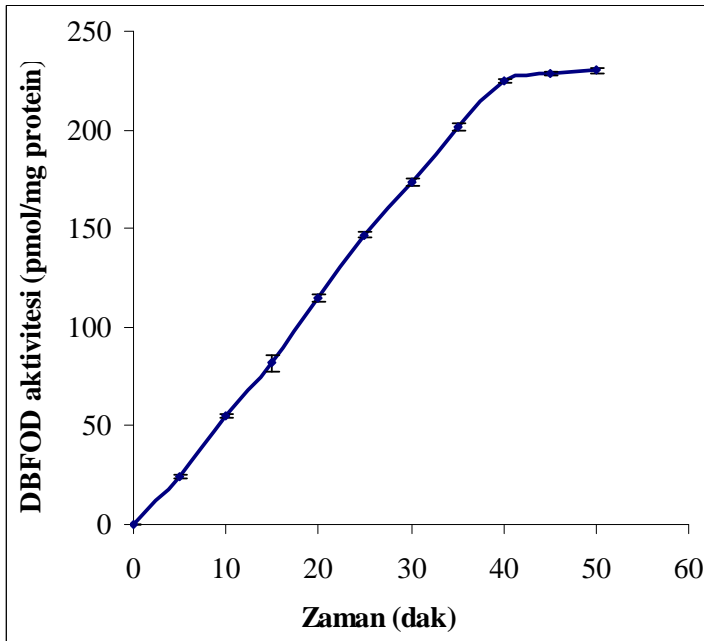
Enzim aktivitesi 30 dakika kadar doğrusallık gösterdi. Bundan sonra da kısmi doğrusallık 40 dakikaya kadar devam etti. Enzim aktivitesinin zamanla değişimini gösteren grafik Şekil 3.9'da verilmiştir.



**Şekil 3.9** *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aromataz aktivitesinin zamanla değişimi.

### 3.3.4.2 Karaciğer DBFOD aktivitesinin zamana karşı değişimi

Enzim aktivitesi 30 dakikaya kadar doğrusallık gösterdi. Bundan sonra da kısmi doğrusallık 40 dakikaya kadar devam etti. Enzim aktivitesinin zamanla değişimini gösteren grafik Şekil 3.10'da verilmiştir.

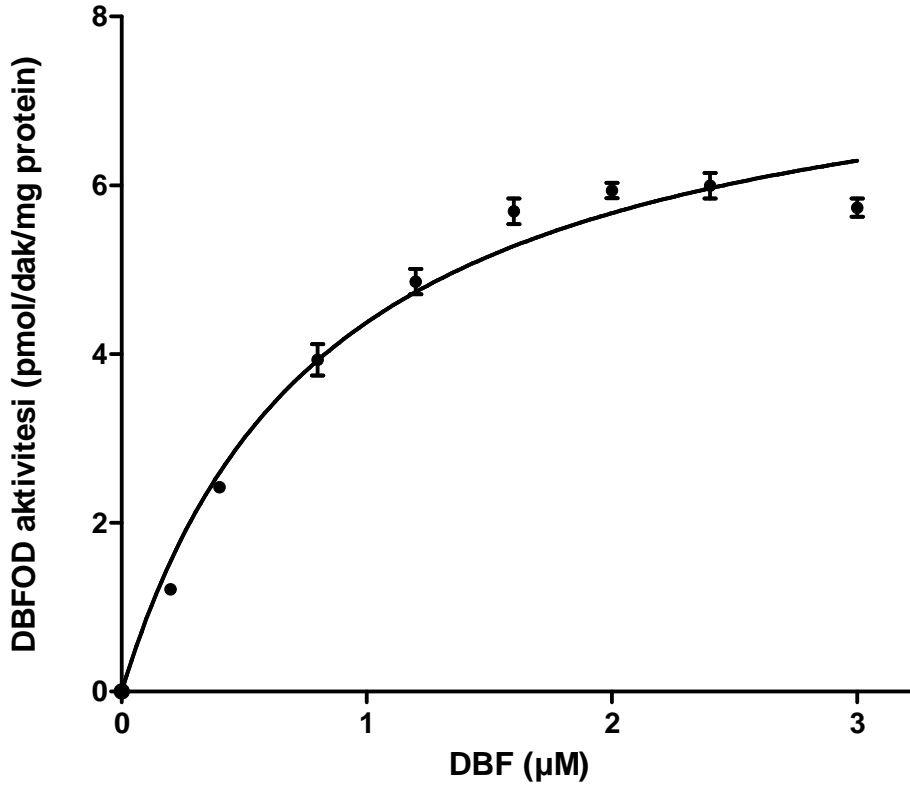


**Şekil 3.10** *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesinin zamanla değişimi.

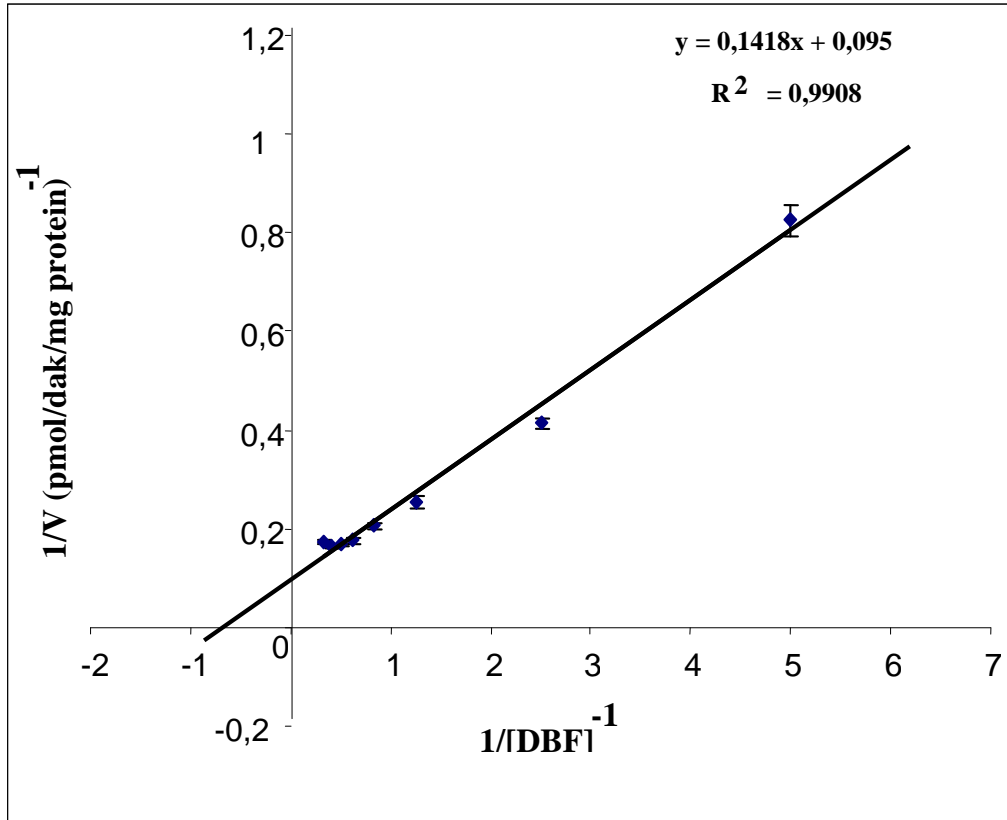
### 3.3.5 *Sparus aurata* mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonu etkisinin tayini

#### 3.3.5.1 Beyin DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,2  $\mu\text{M}$  ile 3  $\mu\text{M}$  arasında değişen DBF konsantrasyonlarında beyin DBFOD aktivitesi çalışıldı. 2  $\mu\text{M}$  substrat konsantrasyonuna kadar aktivitenin artma gosterdiği belirlendi. *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesine DBF konsantrasyonunun etkisi ve Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.11 ve 3.12’de verilmiştir.  $K_m$  değeri  $0,840\pm0,161$   $\mu\text{M}$ ;  $V_{max}$  değeri  $8,054\pm0,550$  pmol/dak/mg protein olarak bulundu.  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri GraphPad Software programı kullanılarak hesaplandı.



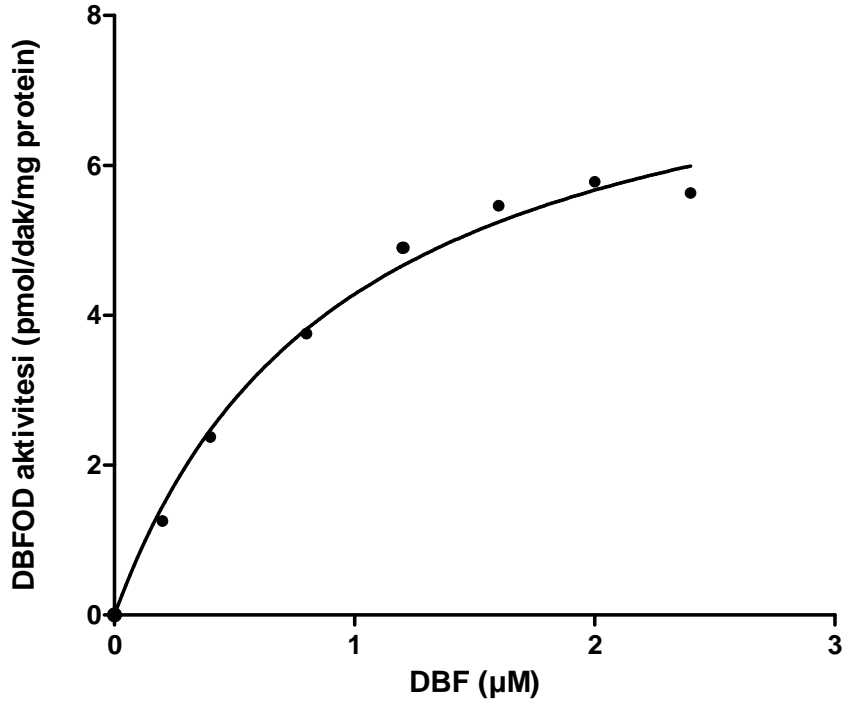
Şekil 3.11 *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD substrat doyum grafiği. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.



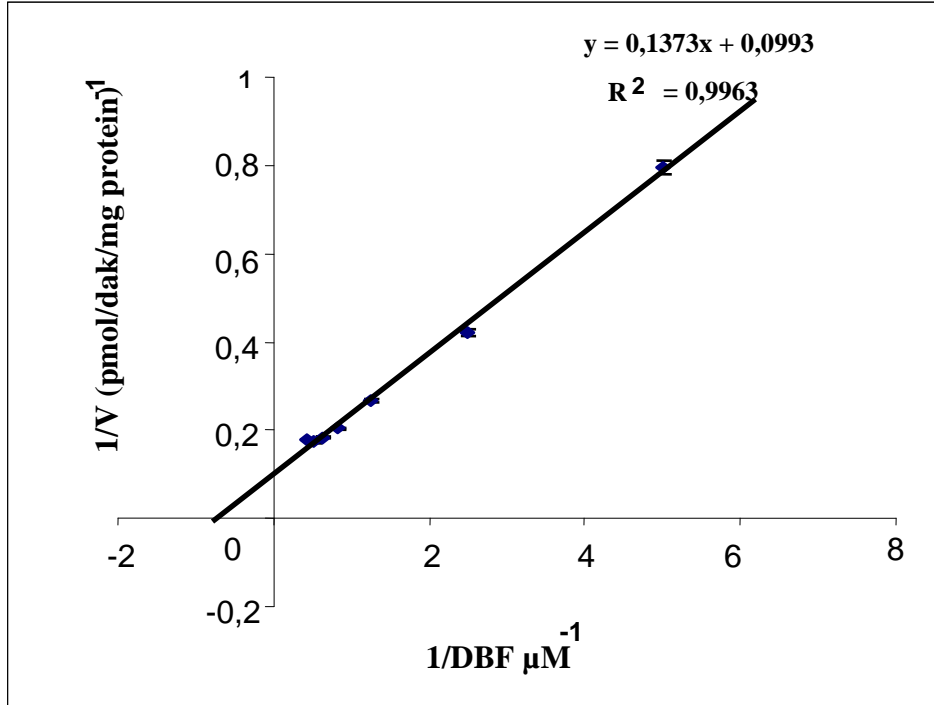
**Şekil 3.12** *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD Lineweaver-Burk substrat doyumu grafiği. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.3.5.2 Karaciğer DBFOD aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,2  $\mu\text{M}$  ile 2,4  $\mu\text{M}$  arasında değişen DBF konsantrasyonlarında karaciğer DBFOD aktivitesi tespit edildi. 2  $\mu\text{M}$  substrat konsantrasyonuna kadar aktivitenin artma gösterdiği belirlendi. *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesine DBF konsantrasyonunun etkisi ve Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.13 ve 3.14'te verilmiştir.  $K_m$  değeri  $0,959 \pm 0,152 \mu\text{M}$ ;  $V_{max}$  değeri  $8,38 \pm 0,543 \text{ pmol/dak/mg protein}$  olarak bulundu.  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri GraphPad Software programı kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.13 *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD substrat doyum grafiği. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

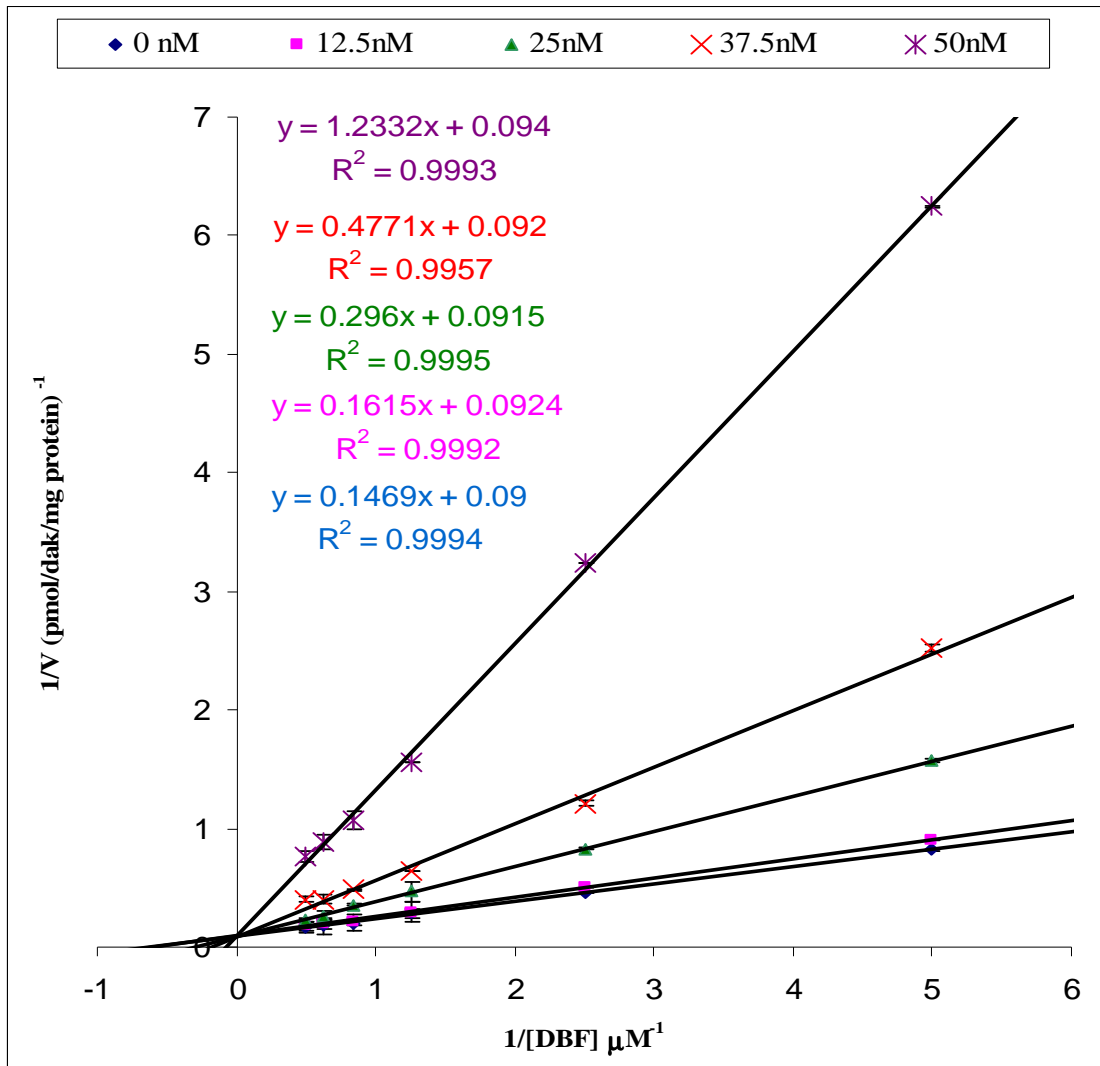


Şekil 3.14 *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD Lineweaver-Burk substrat doyum grafiği. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.3.6 *Sparus aurata* mikrozomal DBFOD aktivitesi üzerine *in vitro* testosteron etkisi tayini

#### 3.3.6.1 Beyin DBFOD aktivitesi üzerine *in vitro* testosteron etkisi tayini

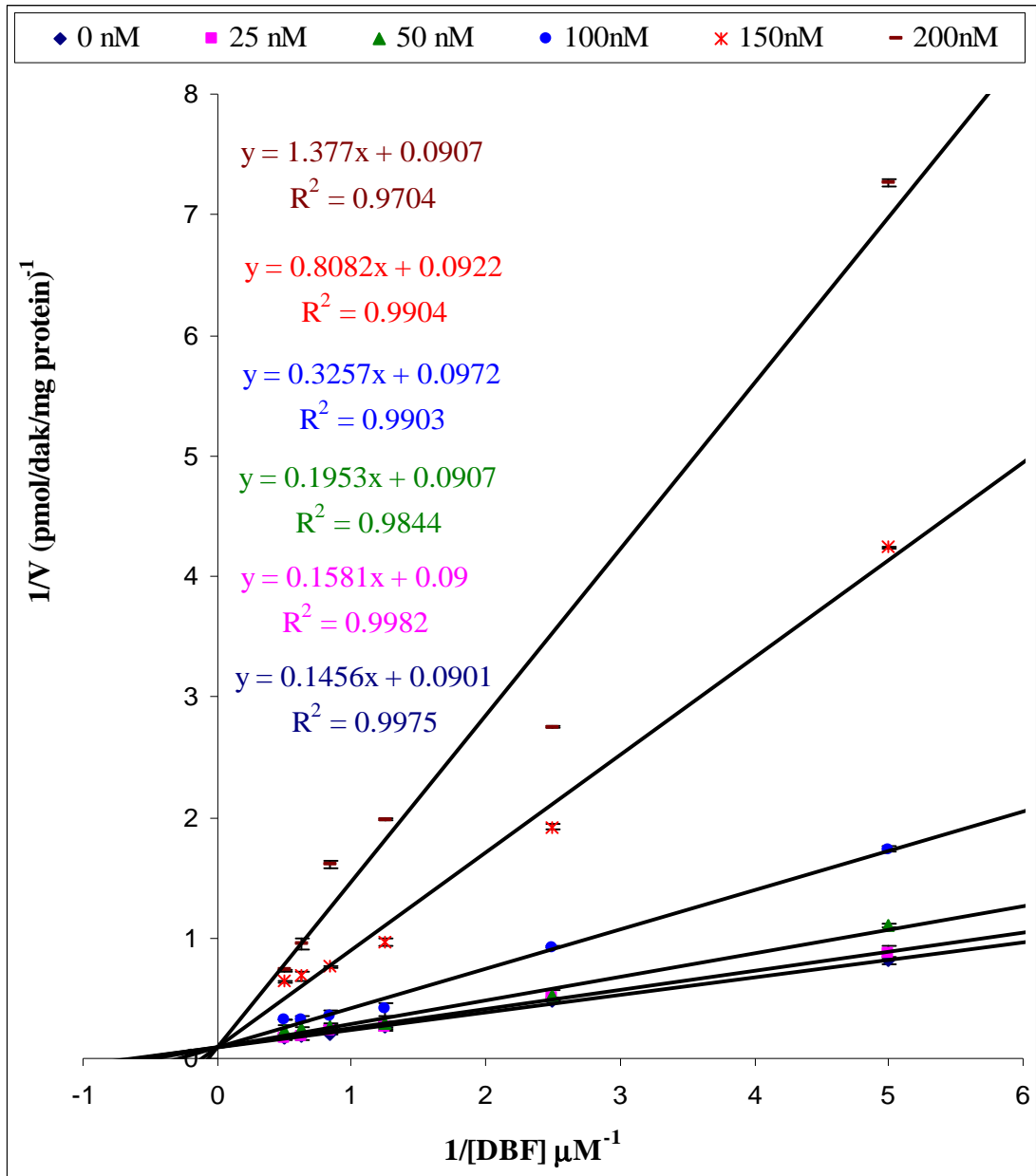
Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 12,5 nM ile 50 nM arasında değişen testosteron konsantrasyonları ile 6 farklı DBF konsantrasyonunda DBFOD inhibisyonu tespit edildi. 12,5 nM'dan 50 nM testosteron konsantrasyonuna doğru inhibisyonun gittikçe arttığı gözlemlendi. Beyin DBFOD aktivitesi üzerine testosteron inhibisyonu yarışmalı inhibisyon tipine uygun bulundu. Testosteron'un *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine inhibisyonu Şekil 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3.15 *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine testosteron inhibisyonu. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.3.6.2 Karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine *in vitro* testosteron etkisi tayini

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 25 nM ile 200 nM arasında değişen testosteron konsantrasyonları ile 6 farklı DBF konsantrasyonunda DBFOD inhibisyonu tespit edildi. 25 nM'dan 200 nM testosteron konsantrasyonuna doğru inhibisyonun gittikçe arttığı gözlemlendi. Karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine testosteron inhibisyonu yarışmalı inhibisyon tipine uygun bulundu. Testosteron'un *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine inhibisyonu Şekil 3.16'da verilmiştir.

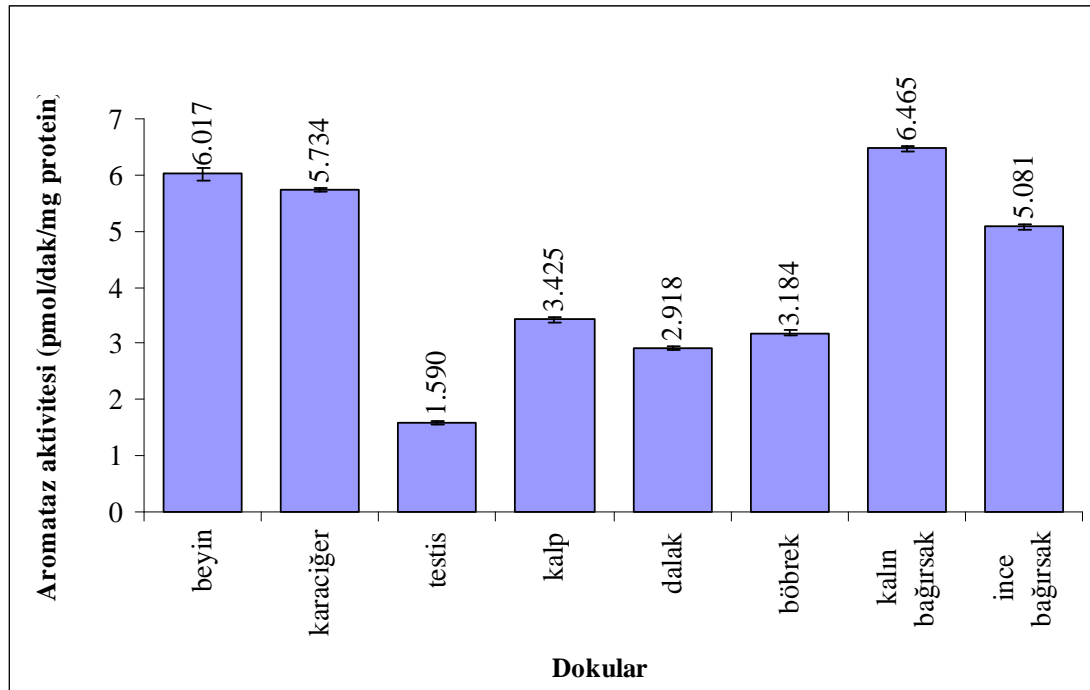


Şekil 3.16 *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine testosteron inhibisyonu. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.



### 3.4. DBFOD Aktivitesinin *Sparus aurata* Balığında Doku Dağılımı

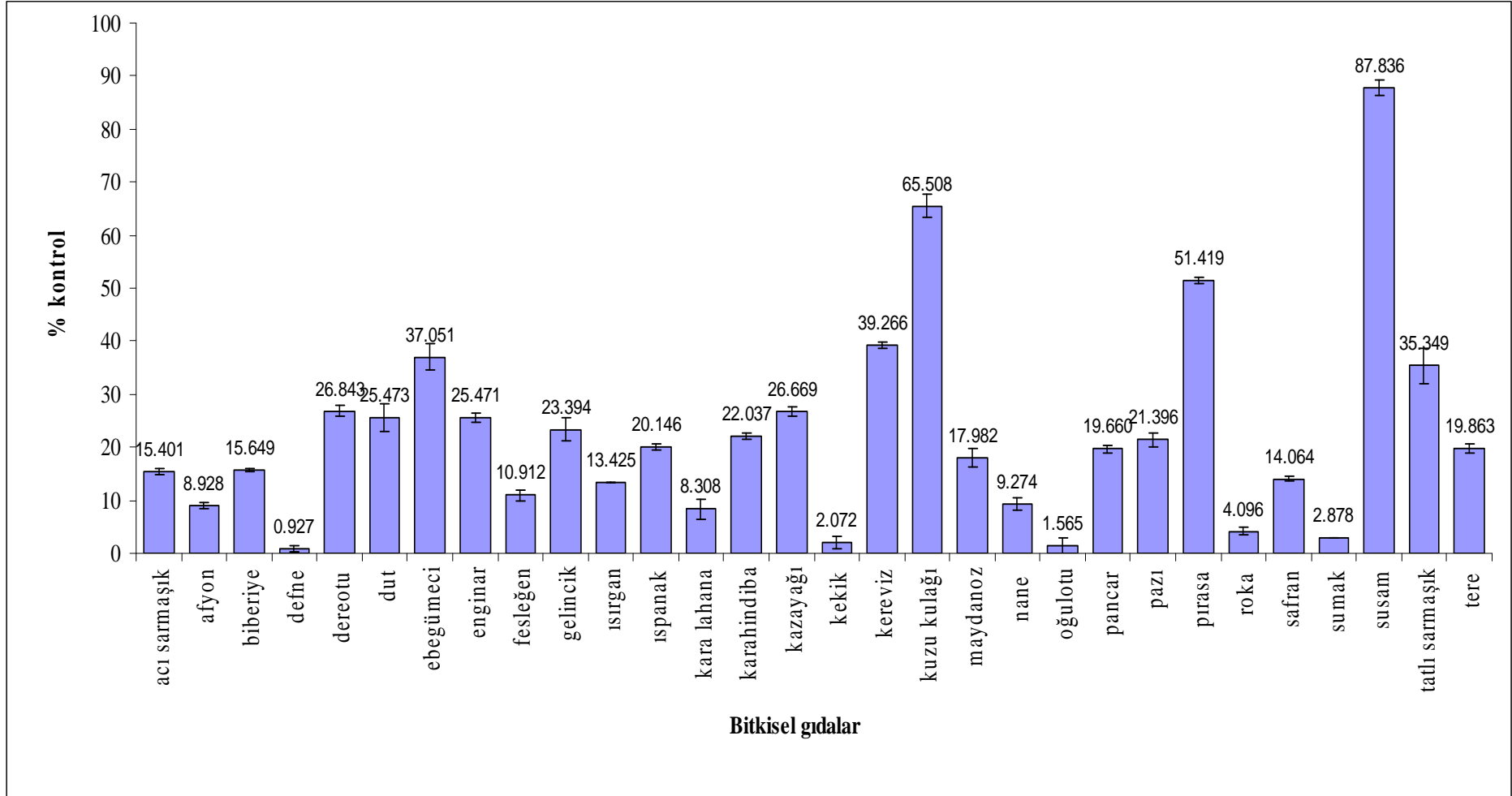
*Sparus aurata* DBFOD aktivitesinin karaciğer dokusu mikrozomlarından elde edilen optimum şartlar kullanılarak diğer dokulardaki dağılımı araştırıldı. Buna göre en yüksek aktivitenin beyin (6,017 pmol/dak/mg protein) ve karaciğerle (5,734 pmol /dak/mg protein) birlikte kalın bağırsak dokusunda (6,465 pmol/dak/mg protein) olduğu tespit edildi (Şekil 3.17).



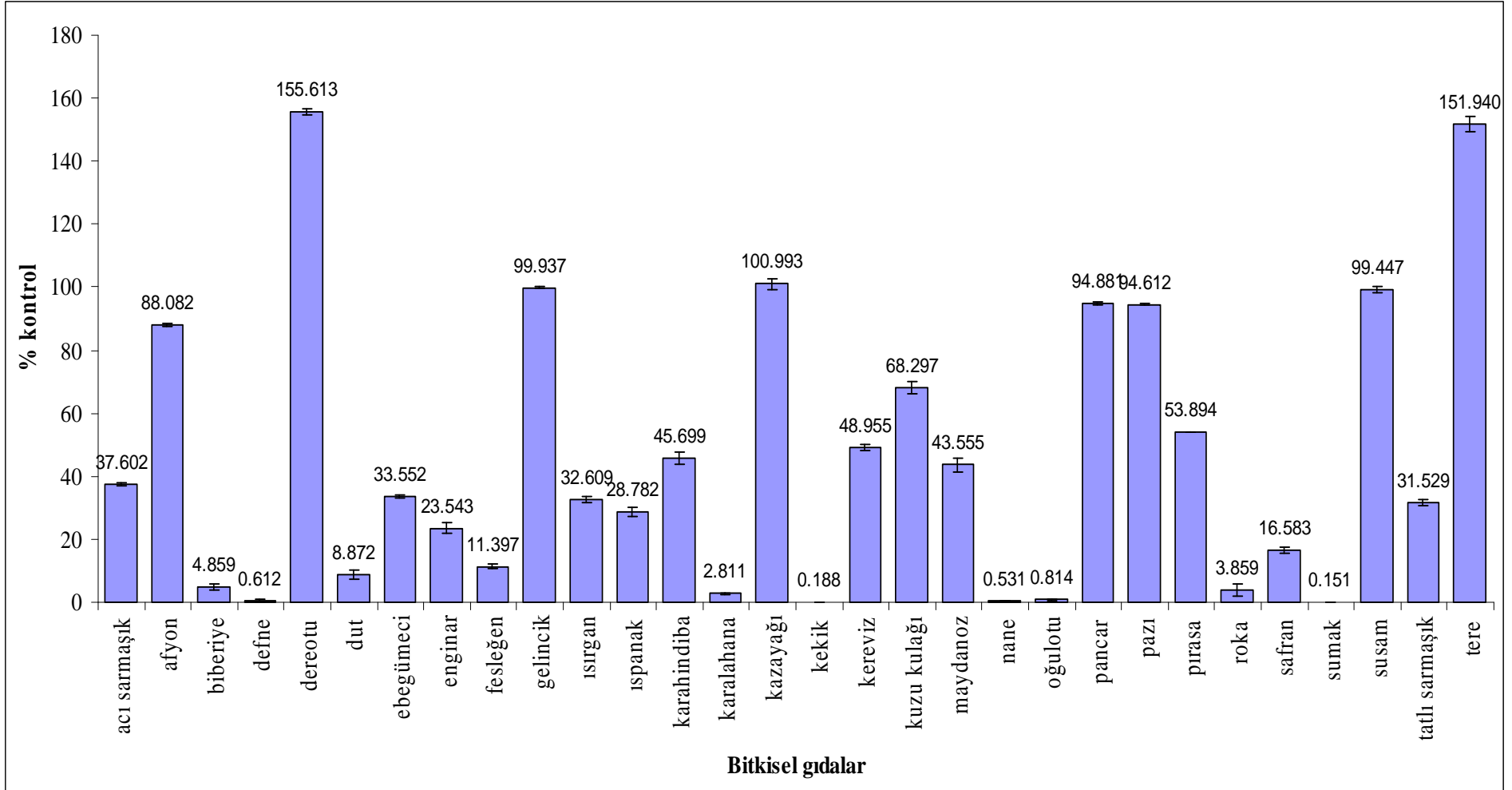
Şekil 3.17 DBFOD aktivitesinin *Sparus aurata* balığında doku dağılımı. Her bir nokta en az iki set deney ve triplet ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

### 3.5. *Sparus aurata* Mikrozomal Beyin ve Karaciğer DBFOD Aktivitesi Üzerine Olağan Bitkisel Gıdaların Etkisi

Materyal ve metotta tanımlandığı gibi olağan bitkisel gıdaların *Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Defne, sumak, roka, nane, karalâhana, kekik ve oğulotunun hem beyin hem de karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine kontrole göre maksimum inhibisyon etkisi gösterdiği, susamın ise her iki aktivite üzerine önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Tere ve dereotu ise beyinde inhibitör etki gösterirken karaciğerde aktivatör etki göstermişlerdir. Olağan bitkisel gıdaların *Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine etkileri Şekil 3.18 ve 3.19’da gösterilmiştir.



Şekil 3.18 *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesi üzerine bitkisel gıdaların etkisi.

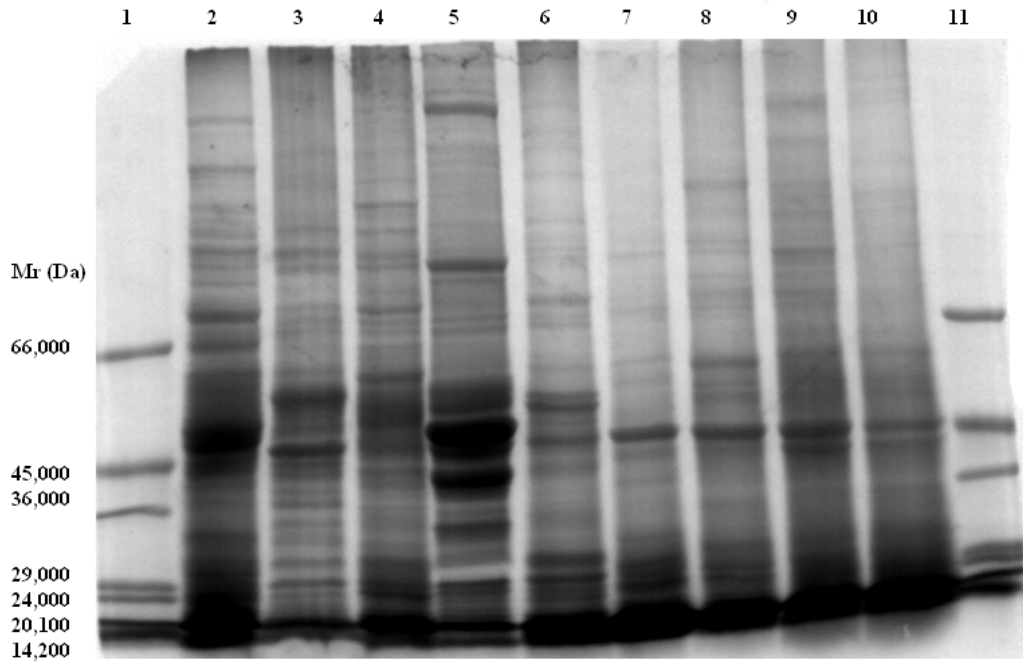


Şekil 3.19 *Sparus aurata* mikrozomal karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine bitkisel gıdaların etkisi.

### 3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blot Analizleri

Şekil 3.20 ve 3. 21'de *Sparus aurata* beyin, karaciğer, testis, dalak, kalp, böbrek, ince ve kalın bağırsak mikrozoamlarının SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ve anti-Rat CYP19A1 IgG'leri kullanılarak gerçekleştirilen Western blot analizlerinin jel ve membranlarının görüntüleri gösterilmektedir.

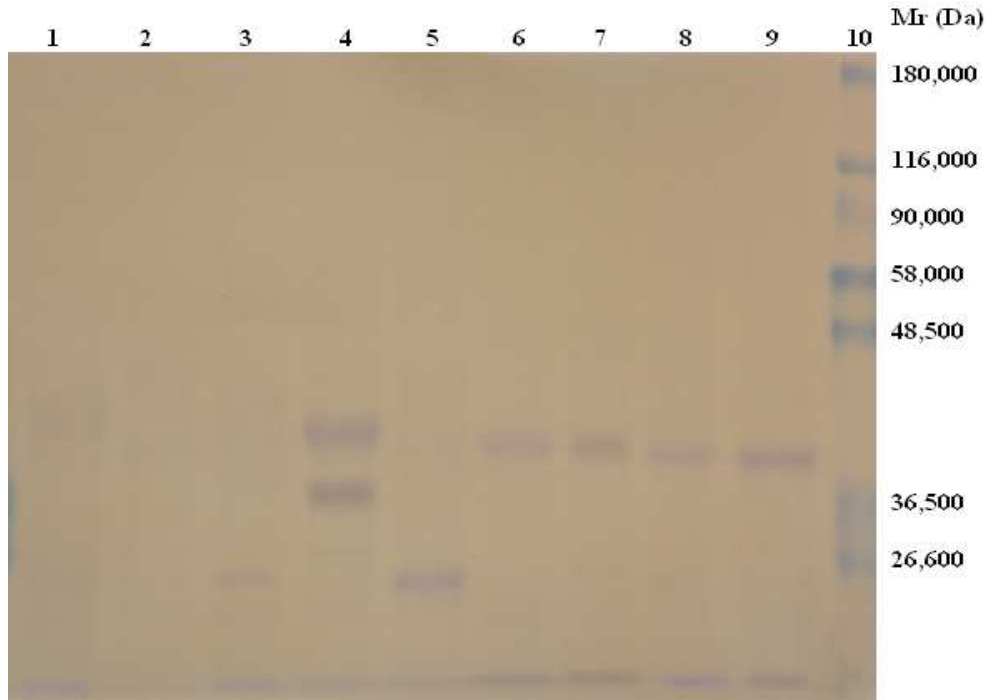
Kuyu 1 ve 11 SDS7 standart protein karışımı [sığır sütü  $\alpha$ -laktalbumini ( $M_r$  14,200), soya fasülyesi tripsin inhibitörü ( $M_r$  20,100), sığır pankreas tripsinojeni ( $M_r$  24,000), sığır karbonik anhidrazı ( $M_r$  29,000), tavşan kası gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazı ( $M_r$  36,000), yumurta albumini ( $M_r$  45,000) ve sığır albumini ( $M_r$  66,000)]; kuyu 2 kontrol rat liver; kuyu 3 beyin; kuyu 4 karaciğer; kuyu 5 testis; kuyu 6 kalp; kuyu 7 dalak; kuyu 8 böbrek; kuyu 9 kalın bağırsak ve kuyu 10 ince bağırsak mikrozoamlarını (120  $\mu$ g) içermektedir.



**Şekil 3.20** *Sparus aurata* beyin, karaciğer, testis, kalp, böbrek, ince ve kalın bağırsak mikrozoamlarının SDS-poliakrilamid jel elektroforezi.

Kuyu 1 kontrol rat liver; kuyu 2 beyin; kuyu 3 karaciğer; kuyu 4 testis; kuyu 5 kalp; kuyu 6 dalak; kuyu 7 böbrek; kuyu 8 kalın bağırsak ve kuyu 9 ince bağırsak mikrozoamlarını (120  $\mu$ g) ve kuyu 10 SDS7B2 boyanmış standart protein karışımını [insan kan plazması  $\alpha_2$  makroglobulini ( $M_r$  180,000), E. Coli  $\beta$ -galaktozidazı ( $M_r$  116,000), insan sütü laktoferrini ( $M_r$  90,000), tavşan kası pirüvat kinazı ( $M_r$  58,000),

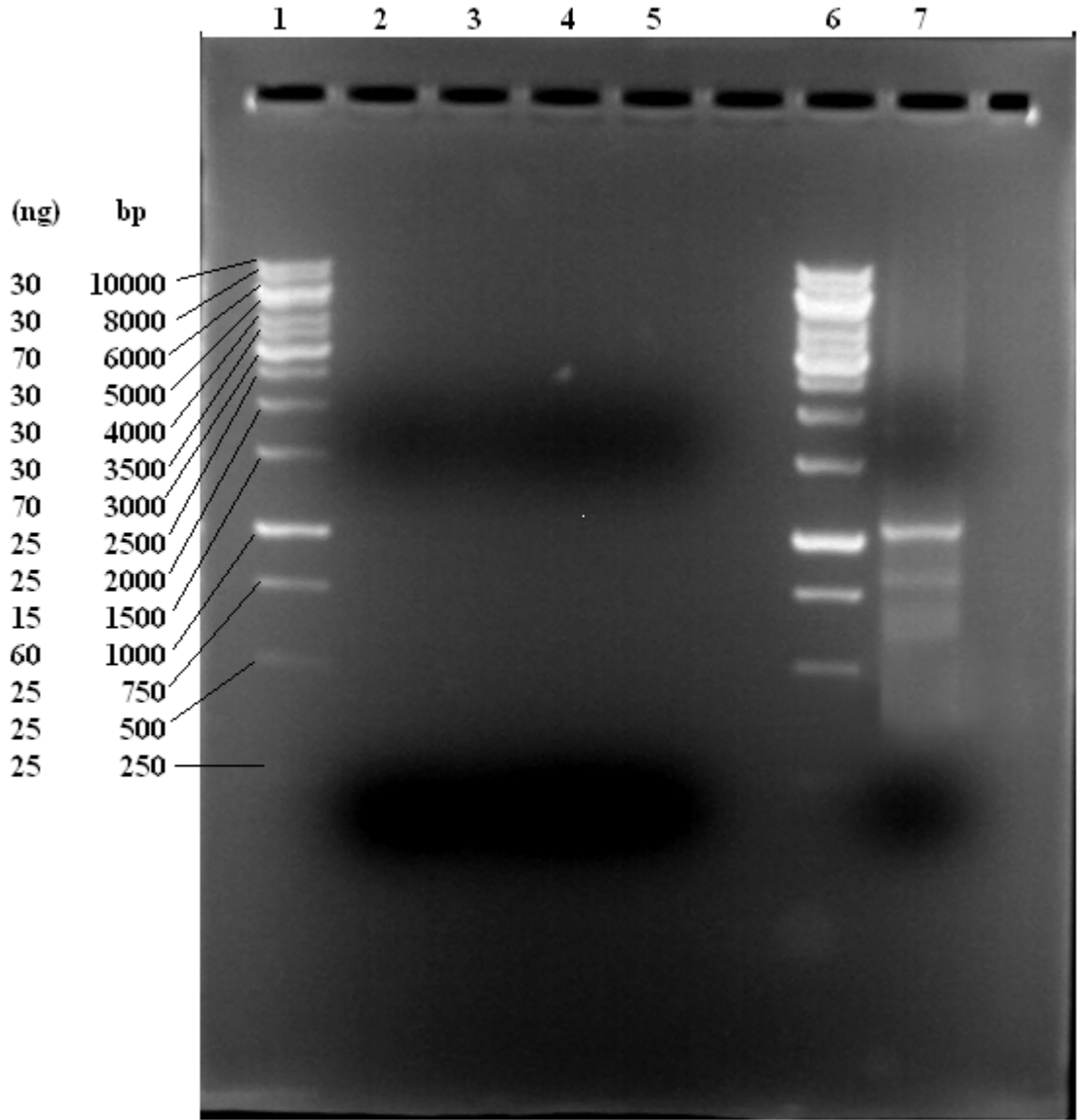
domuz kalbi fumarazı ( $M_r$  48,500), kavşan kası laktik dehidrojenazı ( $M_r$  36,500), tavşan kası triyozfosfat izomerazı ( $M_r$  26,600) içermektedir. Bağlanan antikörlerin görüntülenmesi Materyal ve Metotta tanımlanan substrat solüsyonunda blot'ın inkübasyonu sonucu yapıldı. Western blot analizi sonucunda, poliklonal-anti-Rat CYP19A1'in *Sparus aurata* testis mikrozomları ile oldukça güçlü bir bağlandığı gözlenmiştir.



**Şekil 3.21** *Sparus aurata* ile rat mikrozomlarında CYP19'un poliklonal anti-Rat CYP19A1 IgG kullanılarak immünoblot analizi.

### 3.7. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

*Sparus aurata* beyin, karaciğer ve control rat liver dokularından izole edilen total RNA'ların PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.22'de verilmiştir. Kuyu 1 ve 6 1 kb DNA markörü, kuyu 2 ve 4 beyin, kuyu 3 ve 5 karaciğer, kuyu 7 kontrol rat liver dokularından izole edilen total RNA'ları içermektedir. Jelde beyin ve karaciğer için bant oluşumu gözlenmemiştir. Dolayısıyla rat ve balık aromataz genlerinin birbirinden farklı olduğu söylenebilir.



Şekil 3.22 RT-PCR sonucunun agaroz jeldeki görüntüsü.

#### 4. TARTIŞMA

Balıklarda sitokrom P450 çalışmaları evrim, çevrebilim, toksikoloji ve karsinogenez açısından önemlidir. Bugün bilinen 21,000 farklı balık türü bulunmaktadır ve balıklar olağanüstü farklılıkta habitatlarda yaşayabilmektedirler. Dolayısıyla da balık monooksijenaz sistemine ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Katalitik bir metod kullanılarak sitokrom P450 aromataz aktivitesi ilk olarak rat ve insan beyninde keşfedilmiştir (Naftolin vd 1975). *Longhorn sculpin* ile yapılan çalışmalar, aromatazın son derece yüksek düzeylerinin balık beyninde olduğunu gösteren ilk çalışmadır (Callard vd 1978). Kemikli balıklardaki aromataz bolluğu balıklar arasında bir bireyin yaşam süresince meydana geldiği bilinen sürekli nörojenezle bağlı bir adaptasyon olarak gösterilmektedir (Forlano vd 2001).

Mikroanatomik ve biyokimyasal çalışmalar, aromatazın özellikle balık ön beyninde olduğunu ve bu bölgedeki enzim aktivitesinin memeli ve kuşlarda buna karşılık gelen bölgede ölçülenden 100–1000 kat daha yüksek olduğunu göstermiş (Callard vd 1978, Pasmanik ve Callard 1985) ve daha sonra birkaç türde de onaylanmıştır (Timmers vd 1987, Mayer vd 1991, Gonzales ve Piferrer 2002, 2003).

Yapılan çalışmalarımız sonucunda, İzmir, Çeşme, Ildır köyündeki Pınar Balık üretim tesisinden alınan çipura (*Sparus aurata*) balıklarında mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi, dibenzilfloresein (DBF) substratı kullanılarak karakterize edilmiştir. Deney koşulları protein konsantrasyonu, tampon pH'ı, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon zamanı için belirlenmiş, substrat konsantrasyonunun etkisi enzim için elverişli doyum miktarını sağlamak için çalışılmıştır.

Reaksiyon karışımında kullanılan protein miktarının *Sparus aurata* beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine olan etkisinin incelenmesi sonucunda, reaksiyon ortamındaki mikrozomal protein miktarı, beyin için 20 µg ve karaciğer için ise 40 µg'a kadar arttırıldığında enzim aktiviteleri doğrusallık sergilemiştir. Bu noktalardan sonra reaksiyon hızındaki artış ve aktivite artışı bir hayli yavaşlamıştır. Rutin aktivite ölçümlerinde beyin için 20 µg ve karaciğer için 40 µg protein miktarı kullanılmıştır.

Bütün enzimler için aktivitelerinin en yüksek olduğu pH değerleri mevcuttur. Aktivite genellikle optimum pH değerlerinin altında ve üstünde düşer, bununla beraber bütün enzimlerin pH-aktivite değişimleri aynı şekilde değildir. Çünkü gerek enzimlerin aktif yerlerinin gerekse substratların iyonizasyonu pH'ın fonksiyonu olan asidik ve bazik gruplar içerir. pH değişimi, enzimin aktif merkezinin iyonizasyonunu bozar ya da substrat molekülünün çözünürlüğünü değiştirerek enzim-substrat etkileşimini değiştirir. Ayrıca pH değişimiyle, katalitik olarak aktif olan enzimin amino asit zincirindeki iyonik karakter değiştiği için enzim denatüre olarak katalitik aktivitesini kaybedebilir. *Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesinin pH ile değişimini tanımlama çalışmaları pH'sı 6,25, 6,50, 6,75, 7,00, 7,25, 7,50, 7,75, 8,00, 8,25 ve 8,50 olan potasyum fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirildi. Beyin DBFOD aktivitesi için optimum pH 6,50 buna karşılık karaciğer aromataz aktivitesi için optimum pH 8,25 olarak belirlendi. <sup>3</sup>H-androst-4-en-3,17-dion substratı kullanılarak levrekte (*Dicentrarchus labrax*) çalışılan radyoaktif metotta ise pH 7-9 aralığında olduğunda beyin aromataz aktivitesinin diğer pH değerlerine göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Gonzales ve Piferrer 2002). Buradan bir çıkarım yapacak olursak, en azından enzimin farklı dokular ve farklı canlılardaki aktif yüzeyinin ya da 3D yapısını etkileyen primer dizininin farklı olabileceği söylenebilir.

Enzimlerin katalizlediği herhangi bir tepkimenin hızı, genellikle ısı optimum değere gelinceye kadar artmaktadır. Isı artmaya başladığında kinetik enerji ve hız yükselirken aktivite genellikle belli bir sıcaklığa kadar artış gösterir. Enzimlerin büyük bir kısmı için optimum sıcaklık ilgili enzimin bulunduğu hücre ortamının sıcaklığında veya bunun biraz üstündedir. <sup>3</sup>H-androst-4-en-3,17-dion substratı kullanılarak levrekte (*Dicentrarchus labrax*) çalışılan radyoaktif metotta da inkübasyon sıcaklığındaki değişiklik beyin aromataz aktivitesinde önemli değişikliklerle sonuçlanmış, maksimum aromataz aktivitesi 30-40 °C inkübasyon sıcaklığında elde edilmiştir (Gonzales ve Piferrer 2002). Tilapya'da (*Oreochromis niloticus*) beyin aromataz aktivitesi için optimum sıcaklık 27 °C olarak belirlenmiştir. Dişi bireylerin beyinlerinde aromataz aktivitesi 377,9 pmol/baş/saat olarak hesaplanırken erkek bireylerin beyinlerinde aromataz aktivitesi yaklaşık olarak yarıya düşmüştür (221,5 pmol/baş/saat). 35 °C inkübasyon sıcaklığında dişilerin beyinlerinde aromataz aktivitesi hemen hemen 3 kata kadar azalmış (125,2 pmol/baş/saat), erkeklerde ise dişilere oranla daha düşük bir azalma (113,2 pmol/baş/saat) gözlenmiştir (D'Cotta vd 2001). Değişik inkübasyon



sıcaklıklarının *Sparus aurata* beyin ve karaciğer DBFOD enzim aktiviteleri üzerine etkilerini belirlemek için reaksiyon karışımları 5 °C ile 50 °C arasında değişen sıcaklıklarda inkübe edilerek aktiviteleri tayin edildi. Hem beyin hem de karaciğer DBFOD aktivitesi için optimum sıcaklık 30 °C olarak tayin edilirken 33 °C sıcaklığın üzerinde aktivitelerde azalma gözlemlendi. Bu değer *Sparus aurata*'nın yaşayabileceği sıcaklık aralığı (3–34 °C) ile uyumludur.

Bir enzim tarafından katalizlenen bir reaksiyonun hızı, zamanla azalır. Bunun sebebi reaksiyon ürünlerinin kendi aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon meydana getirmeleri, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin oluşması ve substratın tükenmesidir. *Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktiviteleri üzerine zamanın etkisini belirlemek için reaksiyon karışımları 5 ile 50 dakika arasında değişen sürelerde inkübe edilerek aktiviteleri tayin edildi. Hem beyin hem de karaciğer DBFOD aktivitesi 30 dakika reaksiyon süresine kadar doğrusallık gösterdi. Levrekte <sup>3</sup>H-androst-4-en-3,17-dion substratı kullanılarak beyin aromataz aktivitesi, farklı protein konsantrasyonları (5–20 mg) ve inkübasyon zamanlarında (0–30 dak) test edilmiştir. Her bir inkübasyon süresinde protein konsantrasyonu arttıkça aromataz aktivitesi artmış, buna karşılık her bir protein konsantrasyonunda aromataz aktivitesi yalnızca 30 dakika reaksiyon süresine kadar artmıştır. Bu nedenle reaksiyon süresi 30 dakika olarak tayin edilmiştir (Gonzales ve Piferrer 2002). Verilerimiz levrek ile uyumluluk göstermektedir.

*Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD enzimlerinin substrat doygunluk kinetikleri incelendiğinde, hem beyin hem de karaciğer enzim aktivitesinin 2 µM DBF konsantrasyonu üzerinde doyuma ulaştığı gözlemlenmiştir. Her iki enzim aktivitesi için reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna karşı çizilmesiyle elde edilen grafikler Michaelis-Menten kinetiğine uymaktadır (regresyon katsayısı beyin için 0,9908 ve karaciğer için 0,9963 olarak hesaplanmıştır). Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak yapılan saptamalarda beyin ve karaciğer DBFOD enzimleri için gözlenen  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri sırasıyla 8,054±0,550 pmol/dak/mg protein ve 0,840±0,161 µM ve 8,389±0,543 pmol/dak/mg protein ve 0,959±0,152 µM olarak hesaplanmıştır. Çalışmalarımızda elde etmiş olduğumuz beyin ve karaciğer DBFOD enzimlerinin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri önemli bir derecede farklı değildir, bu da *Sparus aurata* enziminin her iki dokuda dibenzilfloresein için benzer affiniteye sahip olduğunu göstermektedir. <sup>3</sup>H-

androst-4-en-3,17-dion substratı kullanılarak yapılan radyoaktif metotta Medakadaki (*Oryzias latipes*) beyin aromatazının gözlenen  $K_m$ 'si 1,0 nM (Melo ve Ramsdell 2001), insan beyin aromatazının ortalama  $K_m$ 'si 22,2 nmol/L (Steckelbroeck vd 1999), Japon balığı (*Carassius auratus*) beyin aromatazının gözlenen  $K_m$ 'si 8,2 nM (Zhao vd 2001), Afrika kedi balığı (*Clarias gariepinus*) beyin homojenatlarında beyin aromatazının gözlenen  $K_m$ 'si 30 nM (Timmers vd 1987) olarak hesaplanmıştır. Yine aynı metodla levrekte (*Dicentrarchus labrax*) beyin aromataz aktivitesi yaklaşık 100 nM substrat konsantrasyonunda doyuma ulaşmıştır. Bu nedenle substratın limit sınırına ulaşmasını engellemek için standart konsantrasyon olarak 150 nM kullanılmıştır (Gonzales ve Piferrer 2002). Midyelerin sindirim bezi aromatazi için 10  $\mu$ M substrat konsantrasyonu kullanılmış olup aromatazın gözlenen  $K_m$ 'si 32  $\mu$ M ve  $V_{max}$  değeri 1,300 fmol/saat/mg protein olarak bildirilmiştir (Morcillo vd 1999). Bu noktada literatürde değişik türlerde aynı substrat ( $^3$ H-androst-4-en-3,17-dion) için verilen  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri büyük farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıkların türler arası ekzojen veya endojen moleküllerin metabolizmasındaki farklılığı işaret ettiği düşünülebilir. Bizim çalışmalarımızda kullanmış olduğumuz substratın (DBF), DBFOD için oldukça yüksek  $K_m$  değerine sahip olması ise dibenzilfloreseinin DBFOD için çok spesifik olmadığını göstermektedir. Zira dibenzilfloreseinin, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 tarafından da katalizlendiği de ileri sürülmektedir (WEB\_3). Ancak beyin ve karaciğer izozimlerinin benzer katalitik etkiye sahip olduğu söylenebilir.

*Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine testosteron etkisi DBF substratı kullanılarak çalışılmıştır. *In vitro* inhibisyon çalışmaları sonucunda, substratın belirlenen konsantrasyonları için testosteron konsantrasyonu arttıkça artan inhibisyon gözlenmiştir. Elde edilen veriler sonucu çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile inhibisyon kinetikleri çıkarılmıştır. Hem beyin hem de karaciğer DBFOD enzimi yarışmalı inhibisyon tipine uygun bulunmuştur. Bu sonuç DBFOD'nin DBF ile *in vitro* ölçülebilirliğinin en güçlü kanıtıdır. Belirlenen aktivite değerleri, optimum protein konsantrasyonu, pH, sıcaklık, Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlenen  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri ve çalışılan *in vitro* testosteron inhibisyon kinetikleri Tablo 4.1'de verilmektedir.

**Tablo 4-1** *S. aurata* bireylerinde mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD enziminin karakterizasyonu verileri ve *in vitro* testosteron inhibisyonu.

DBFOD	Aktivite (pmol/dak/mg protein)	Protein Konsantrasyonu ( $\mu$ g)	Optimum pH	Optimum sıcaklık ( $^{\circ}$ C)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (pmol/dak/mg protein)	Testosteron inhibisyon tipi
<b>Beyin</b>	6,017	20	6,50	30	0,840 $\pm$ 0,161	8,054 $\pm$ 0,550	Yarışmalı
<b>Karaciğer</b>	5,734	40	8,25	30	0,959 $\pm$ 0,152	8,389 $\pm$ 0,543	Yarışmalı

Yapmış olduğumuz çalışmada, *Sparus aurata* karaciğer mikrozomlarında ortalama DBFOD aktivitesi 5,734 pmol/dak/mg protein, beyin mikrozomlarında ise ortalama DBFOD aktivitesi 6,017 pmol/dak/mg protein olarak hesaplanmıştır.  $^3$ H-androst-4-en-3,17-dion substratı kullanılarak yapılan radyoaktif metotta, erkek medakada (*Oryzias latipes*) aromataz aktivitesinin ön beyinde yüksek iken (63–75 fmol/saat) arka beyinde daha düşük (< 25 fmol/saat) olduğu gözlenmiştir (Melo ve Ramsdell 2001). Tatlı su levreği (*Perca fluviatilis*) ve kızılözün (*Rutilus rutilus*) eşeyssel olarak olgunlaşmamış dişilerinde beyin aromataz aktivitesinin, eşeyssel olarak olgunlaşmış dişilerde ölçülenden (1,7–2,5 pmol/saat/mg protein) önemli bir derecede düşük (~ 0,5 pmol/saat/mg protein) olduğu rapor edilmiştir (Noaksson vd 2001). Üreme sezonuna girmiş yetişkin levrekte (*Dicentrarchus labrax*) beyin aromataz aktivitesi 2,04 pmol/mg protein/saat iken karaciğer aromataz aktivitesi 0,08 pmol/mg protein/saat olarak bildirilmiştir, buna karşılık beyin esas ana parçalarına disekte edildiğinde beyin aromataz aktivitesinin koku soğancığı, telensefalon ve hipotalamusu içeren ön beyinde konsantre olduğu (2,6–16,2 pmol/mg protein/saat) tespit edilirken, balıklar bir yıl boyunca örneklendiğinde en düşük beyin aromataz aktivitesinin yazın sonunda (~ 2 pmol/mg protein/saat), en yüksek beyin aromataz aktivitesinin ise üreme sezonu olan Şubat ayında (~ 7 pmol/mg protein/saat) olduğu tespit edilmiştir (González ve Piferer 2003). Afrika kedi balığı (*Clarias gariepinus*) beyin homojenatlarında beyin aromataz

aktivitesi 3,7 pmol olarak bildirilmiştir (Timmers vd 1987). Midyelerin (*Mytilus galloprovincialis*) sindirim bezlerinde radyoaktif metodla yapılan bir çalışmada aromataz aktivitesi 345 fmol/saat/mg protein olarak bildirilmiştir (Morcillo vd 1999).

Aromataz aktivitesi tüm omurgalılarda bulunur ve çoğunlukla memelileri temel olarak yapılan çalışmalarda, beyin, yumurtalık, testis, plasenta, karaciğer, böbrek, yağ dokusu, adrenal bezler, kan damarı, deri ve kemik gibi birkaç doku ve organda gösterilmiştir (Simpson vd 1994). Aromataz enzimi doku spesifik yolla katalize edilmektedir. Bu nedenle, *Sparus aurata*'nın değişik dokularında DBFOD aktivitesi tayin edildi (Şekil 3.17). DBFOD aktivitesinin *Sparus aurata*'da beyin (6,017 pmol/dak/mg protein), karaciğer (5,734 pmol/dak/mg protein) ve kalın bağırsakta (6,465 pmol/dak/mg protein) en yüksek düzeyde olduğu tespit edildi. Balıklarda kalın bağırsak için literatürde herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Bu sonuç üzerinde yapılacak daha geniş çalışmalar literatüre yeni bir bilgi kazandırabilir. Levrekte (*Dicentrarchus labrax*) aromataz aktivitesinin baştanbaşa dağılımını araştırmak için farklı embriyonik orjinler gösteren birkaç doku homojenize edilip analiz edilmiştir. Bunlar tüm beyin ve yumurtalık, karaciğer, kalp, iç organlara ait yağ, böbrek, dalak, testis ve kas parçalarını içerir. Dokular, üreme sezonuna giren Kasım-Ocak ayları arasında örneklenmiş, 400–500 gr vücut ağırlığına sahip yetişkin balıklardan elde edilmiştir. Disseksiyondan sonra homojenizasyon ve inkübasyon koşulları tüm balıklar için aynıdır. Miligram protein başına aromataz aktivitesi miktarının en yüksekten en düşüğe doğru beyin, yumurtalık, iç organlara ait yağ, karaciğer ve böbrekte saptandığını gösterilmiştir. İncelenen diğer dokularda (kalp, testis, kas ve dalak) aromataz aktivitesi düşüktür (González ve Piferrer 2003). *Sparus aurata* testisinde tespit etmiş olduğumuz DBFOD aktivitesi (1,590 pmol/dak/mg protein), Pasmanik ve Callard (1998) tarafından Japon balığı (*Carassius auratus*) testisinde rapor edilmiş aromataz aktivitesi (1,2 pmol/dak/mg protein) ile uyumludur. Birçok türde aromataz aktivitesi gonadlar ve beyinle sınırlanmıştır. Plasentada aromatazın varlığı sadece primatlar, domuzlar, atlar ve sığırlarda gösterilmiştir. Kuşların birkaç türünde, aromataz aktivitesi, beyin ve karaciğerde bulunmuştur, fakat testis, kas ve adrenal bezlerde bulunamamıştır (Silverin vd 2000). *Paralichthys lethostigma*'da yumurtalık ve dalak yüksek aromataz aktivitesine sahipken beyin, karaciğer, solungaç, ve testiste aromataz aktivitesi düşüktür, buna karşılık bağırsak, böbrek, kas ve kalpte aromataz aktivitesi yoktur (Luckenbach vd 2005). Burada asıl şaşırtıcı olan dalakta beyin ve karaciğerden

daha yüksek aromataz aktivitesinin görülmesidir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da az da olsa dalakta DBFOD aktivitesi (2,918 pmol/dak/mg protein) gözlenmiştir. Dalakta aromatazın varlığı nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*, Kwon vd 2001), kaya balığı (*Trimma okinawae*, Kobayashi vd 2004) ve insan fetusunda (Price vd 1992) da rapor edilmiştir. Bu bulgular dalağın aromataz tarafından östrojen sentezleyebileceği fikrini düşündürür. Bununla beraber dalakta aromatazın rolü henüz anlaşılamamıştır. Renkli kaplumbağalarda (*Chrysemys picta*) aromataz aktivitesi, beyinde maksimum ve gonadlarda da keşfedilebilir düzeydedir, fakat kas, karaciğer ve yağ dokusunda negatiftir (Callard vd 1977). Pejerrey balığı (*Odontesthes bonariensis*) beyin aromatazının doku ekspresyon analizi, başlıca her iki eşeyin beyin hipofiz bezi ve böbreğinde ifade edildiğini göstermiştir. Böbrekte bu enzimin varlığı sürpriz değildir, çünkü aromataz aktivitesi levrek böbreğinde de (0,03 pmol/saat/mg protein) gösterilmiştir (González ve Piferrer 2003, Blazquez ve Piferrer 2004, Strobl-Mazzulla vd 2005). *Sparus aurata* böbreğinde ise DBFOD aktivitesi 3,184 pmol/dak/mg protein olarak tespit edildi. Ancak böbreğin steroidojenik kabiliyeti halen tartışma konusudur. Tetrapod omurgalılar, esasen adrenokortikosteroidleri üreten steroidojenik aktiviteye sahip olduğu bilinen ayrı bir adrenal beze sahiptirler ve bu hayvanların böbreklerinin steroidojenik olmadığı bilinmektedir. Kemikli balıklarda ise adrenal bez böbrek içine oturur (Milano vd 1997) ve bundan dolayı kemikli balıkların böbreklerinde steroidojenik hücreler bulunmuştur. Androjen ve östrojen sentezi nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) böbreğinde saptanmıştır. Bununla beraber balık böbreğinde şekillenmiş östrojenin fizyolojik rolü bilinmemektedir (Kwon vd 2001). Kemikli balıklarla yürütülen daha önceki birkaç çalışmada, karaciğerin aromataz aktivitesi ve ifadesi açısından negatif olduğu bulunmuştur (Kwon vd 2001). Buna karşılık hepatik aromatazın varlığı memelilerde belgelerle ispat edilmiş ve hem olgun (González 1992) hem de olgunlaşmamış sıçanlarda (Katagiri vd 1998) da bulunmuştur. Karaciğer tüm omurgalılarda P450 enzimlerinin yüksek bolluğu ile bilinir, fakat östrojen faaliyeti için tayin edilmiş bir hedef olan yumurta yumurtlayan omurgalılardaki bu organda aromatazın kesin fonksiyonu açık değildir. Yeşil kurbağada (*Rana esculenta*) hepatik aromataz, testosteronun östradiolle dönüşümünden sorumludur ve hepatik vitellojen sentezinde yumurtalıktan salgılanan östradiolle olası bir tamamlayıcı şeklinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Asisi vd 2000). Benzer durum vitellojen sentezinin maksimum olduğu Kasım ve Ocak ayları arasında örneklenen levreklerde olmakta ve bu onun karaciğerinde gözlenen aromataz aktivitesinin varlığını açıklamaktadır (González

ve Piferrer 2003). Sonuçta elde edilen veriler aromataz enziminin farklı türlerde, farklı düzeylerde ifade edildiğini göstermektedir. Düşük aktivitelere endojen (yaş, cinsiyet, mevsim vb) veya çevresel (inhibitörler, ekzojen steroidler vb) faktörler neden olmuş olabilir.

Balık sitokrom P450 veya monooksijenazlarının memelilerle ortak özellikler paylaştığı gösterilmiştir (Şen ve Arınç 1998). Ancak *Sparus aurata* beyin ve karaciğer dokularından izole edilen RNA'nın rat primerleri ile yapılan RT-PCR analizi sonucunda agaroz jelde bant oluşumu gözlenmemiştir. Bu da bize rat ve balık aromataz genlerinin birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. Aromataz özelliklerinin türden türe farklılık göstermesi nedeni ile türlerin bir biyomarkör olarak kullanılabilirliği için öncelikli olarak türlerde bulunan enzim tipinin karakterize edilmesi önemlidir. Her ne kadar kemikli balıklar diğer omurgalılardan daha yüksek aromataz aktivitesine sahip ise de fonksiyonu spekülatif olmayı korumaktadır.

Omurgalıların hepsinde aromataz enzimi harikulade bir varyasyon göstermektedir. Gelinas ve Callard'a (1997) göre insan plasenta aromatazına karşı yapılan antikor Japon balığı (*Carassius auratus*) beyin aromatazına doğru bir şekilde bağlanamamıştır. Gelinas vd (1998) tarafından bildirildiğine göre; Japon balığında aromataz aktivitesi üreme koşullarına bağlı olarak mevsimsel olarak değişmektedir. Muhtemelen bu durum test edilen birkaç balığın üreme konumunda olmamasından dolayı aromataz bazal seviyesinin düşmesinden kaynaklanmıştır. Yine aynı şekilde Japon balığında kullanılan antikor Tilapya balığında çalışmamıştır. *Sparus aurata* beyin, karaciğer, testis, kalp, dalak, böbrek, kalın bağırsak ve ince bağırsak mikrozomlarında yapmış olduğumuz Western blot analizi sonucunda, poliklonal-anti-Rat CYP19A1'in *Sparus aurata* testis, kalp, dalak, böbrek, kalın bağırsak ve ince bağırsak mikrozomları ile oldukça güçlü bir bağlandığı gözlenmiştir. Bu sonuç bize testisin düşük DBFOD aktivitesine rağmen yüksek CYP19 protein seviyesine sahip olduğunu, diğer dokuların ise moleküler büyüklüklerinin birbirlerinden farklı olması da bu dokuların farklı promotorlar tarafından ifade edildiği fikrini desteklemektedir. Ayrıca kullanılan antikor gonadal forma (CYP19A1) ait olduğundan beyin ve karaciğer aromatazına doğru bir şekilde bağlanamamıştır.

Flavonoidler, doğal olarak meydana gelen polifenolik bileşen ailesinin bir kısmını teşkil ederler. Flavonoidler bitkisel ilaçlar gibi meyvalar, sebzeler, kuruyemişler gibi

bitkisel yiyecekler ve kahve, çay, şarap gibi bitkisel içeceklerdeki bileşenlerin en etkili sınıfını teşkil ederler (Hollman ve Katan 1997). 5000'den fazla flavonoid tanımlanmış olup altı farklı sınıfta toplanmışlardır: flavonlar (apigenin, luteolin), flavonoller (quercetin, myricetin), flavanonlar (naringenin, hesperidin), katekinler veya flavanoller (epikatekin, gallokatekin), antosiyanidinler (siyanidin, pelargonidin) ve izoflavonlar (genistein, daidzein) (Ross ve Kasum 2002). Flavonoid yapısında 8000'den fazla bileşen tanımlanmıştır (Hodek vd 2002). Flavonoidler polar yapıda olan oldukça güvenli bileşenlerdir, vücutta toksisiteye neden olmazlar. Flavonoidler ve izoflavonlar yapısal olarak endojen steroid hormonlara (östradiol) benzerdirler ve hem östrojenik hem de antiöstrojenik aktivitelere sahiptirler (Moon vd 2006). Dolayısıyla fitoöstrojenler, östrojen reseptörüne bağlanan ve östrojen faaliyetinin birçok bileşenini indükleyen bitki kimyasallarıdır. Özellikle aromatazin aktif bölgesine bağlanırlar ve aromatazin yarışmalı inhibitörleri olarak bilinirler (Wang vd 1994, Kao vd 1998). Çalışmalarımızda *Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine olağan bitkisel gıdaların etkileri araştırıldı. Kullanmış olduğumuz bitkisel gıdaların sık tüketilen yöresel Türk gıdaları olmasına özen gösterilmiştir. Defne, kekik, sumak, roka, nane, oğulotu ve karalâhana hem beyin hem de karaciğer DBFOD aktivitesi üzerine maksimum inhibisyon etkisi göstermişlerdir. Beyin ve karaciğerde sırasıyla defne, %99,073 ve %99,388; kekik, %97,928 ve %99,812; sumak, %97,123 ve %99,849; roka, %95,904 ve %96,141; nane, %90,726 ve %99,469; oğulotu, %98,435 ve %99,186; karalâhana ise %91,69 ve %97,189 inhibisyona neden olmuşlardır. Susam ise beyinde %12,173 ve karaciğerde %1,33 inhibisyona neden olmuştur. Tere ve dereotu ise beyinde sırasıyla %80,139 ve %73,16 inhibitör etki gösterirken karaciğerde aktivatör etki göstermişlerdir. Terenin alkaloidler yönünden oldukça zengin olduğu bildirilmiştir (Majer vd 1998). Dereotunun ise Teuber ve Herrmann (1978) tarafından flavonol içerdiği tespit edilmiştir. Her ne kadar susam *Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer DBFOD aktivitesi üzerinde çok düşük inhibisyon etkisi gösterse de susamın lipit peroksidasyonu üzerinde *in vitro* antioksidan aktiviteye sahip olduğu Cheng vd (2002) tarafından bildirilmiştir. Maydanoz diabetik ratlerde glutatyon (GSH) enzim aktivitesini arttırmış buna karşılık kan glukozunu azaltmıştır. Diabetik ratlerde lipit peroksidasyonundan sonra oluşan serbest radikaller karaciğer hasarına neden olmuş ancak bu durum maydanoz ekstraktı ile beslenen ratlerde lipit peroksidatörlerini normal seviyesine indirdiği ve hepatik dokunun oksidatif hasarının inhibe edildiği

gözlenmiştir (Ozsoy-Sacan vd 2006). Bu nedenle maydanozun antioksidan özellikte olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır. Fitokimyasal araştırmalar maydanozda flavonoidlerin (apiin, luteolin, apigenin glikozitleri) (Fejes vd 2000), karotenoidlerin (Francis ve Isaksen 1989), askorbik asit (Davey vd 1996), fenolik bileşenler (Duthie 1999), kumarinler (bergapten, imperatorin) ve uçucu bileşenlerin (apiol) (Fejes vd 2000) olduğunu göstermiştir. Flavonoidler, fenolik bileşenler, askorbik asit ve tokoferol içeren bitkisel gıdaların antioksidan etkileri rapor edilmiştir (Andallu ve Varadacharyulu 2003, Ozsoy-Sacan vd 2006). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise maydanoz *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesini % 82,02, karaciğer DBFOD aktivitesini ise % 56,445 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Sumak içerdiği askorbik asit ve tanin nedeniyle serbest radikal ve lipit peroksidasyonunda etkilidir (Candan ve Sökmen 2004). Yalnız, antioksidan aktivitesinden sorumlu bileşenler henüz sumakta tanımlanmamıştır. Onun için, bizim sonuçlarımızın sumak bitkisinin antioksidan doğasının araştırılmasına bir başlangıç noktası olacağını ümit ediyoruz. Kekik yaprakları da içerdikleri yüksek fenolik bileşenler (thymol, carvacrol) ve flavonoidler (apigenin, luteolin) nedeniyle asetilkolinesteraz enzim aktivitesini inhibe ederken (Jukic vd 2007), fare karaciğerinde glutatyon S-transferaz enzim aktivitesini arttırmıştır (Sasaki vd 2005). Conforti vd (2006) tarafından defnenin antioksidan etkisi olduğu, Ferreira vd (2006) tarafından ise defnenin asetilkolinesteraz aktivitesini % 64 oranında inhibe ettiği bildirilmiştir. Defne yapraklarının flavonoidler, alkaloidler ve fenolik bileşenler içerdiği ve lipit peroksidasyonunda inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir (Simic vd 2003). Bu sonuçlar defnenin antioksidan etkisinin olduğu düşüncesini desteklemektedir. Oğulotu, 2000 yıldan fazla bir süredir bitkisel ilaç olarak uzun yaşamın sırrı ve hafızayı kuvvetlendirdiği düşüncesiyle kullanılmaktadır. Bitkinin yaprakları flavonoidler, terpenler, fenolik bileşenler ve tanin içermektedir (Bolkent vd 2005). Bitkinin asetilkolinesteraz aktivitesini de %65 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir (Ferreira vd 2006). Hiperlipidemi lipit metabolizmasındaki değişikliklerden meydana gelen bir rahatsızlıktır. Lipit deposundaki artış karaciğerdeki trigliserit depolarındaki artışla açıklanabilir. Hiperlipidemik ratlerde karaciğer dokusunda GSH düzeylerinde azalma gözlenirken, oğulotu ekstraktları ile beslenen hiperlipidemik ratlerde karaciğerdeki GSH miktarının kontrollere göre önemli bir derecede arttığı rapor edilmiştir (Bolkent vd 2005). Bu da hiperlipidemik hayvanlarda oğulotunun serum kolesterol ve lipit düzeylerinde önemli bir azalmaya



neden olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla oğulotu, hiperlipidemik hayvanlarda lipit peroksidasyonundan oluşan serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarı önlemektedir. Aynı durum pancarda da Ozsoy-Sacan vd (2004) tarafından tespit edilmiştir. Fitoterapide ise oğulotu antiseptik, antiviral, antimikrobiyal ve antioksidatif olarak kullanılmaktadır. Pancar üzerinde yapılan fitokimyasal araştırmalarda içeriğinde yağ asitleri, fosfolipitler, glikolipitler, polisakkaritler, askorbik asit, folik asit, pektin, saponinler ve flavonoidlerin varlığı saptanmıştır (Ozsoy-Sacan vd 2004). Nane ekstraktının içerdiği ögenol, rosmarinik asit ve tokoferol ile antioksidan ve antiperoksidan etkiye sahip olduğu artan GST aktivitesiyle doğrulanarak bildirilmiştir (Samarth vd 2006). Samman vd (1998) tarafından bildirildiğine göre, nane tümör oluşumuna karşı koruyucudur ve bu özelliği onun antimutajenik özelliğinden kaynaklanmaktadır. Beyaz dut (*Morus alba*) geleneksel Çin ilaçlarında karaciğer ve böbrek koruyucu ve idrar söktürücü olarak kullanılmıştır (Fukai vd 2003). Bunun dışında antiviral, antimikrobiyal (Fukai vd 2002, Kim vd 2003), sinir sistemini koruyucu (Yu vd 2005) etkileri de vardır. Yüksek flavonoid ve polifenol içeriği antioksidan aktivitesini güçlendirmektedir (Maksimovic vd 2005). Yapmış olduğumuz çalışmada dutun *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesini % 74,528 ve karaciğer DBFOD aktivitesini ise %91,128 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Gebhardt (1997) tarafından bildirildiğine göre, enginar da antioksidatif potansiyele sahip olup hepatik kolesterol biyosentezini inhibe edebilmektedir. Bu çalışmada, Enginarın *Sparus aurata* mikrozomal beyin DBFOD aktivitesini % 74,532 ve karaciğer DBFOD aktivitesini ise % 76,457 oranında inhibe ettiği tespit edildi. Isırgan Türkiye’de genellikle kanser hastalarında bitkisel ilaç şeklinde kullanılmaktadır. Bitkinin flavonoid içeriği bağışıklık sistemini güçlendirerek kanser oluşumu riskini azaltabilmektedir (Akbay vd 2003). Dolayısıyla fitoöstrojenlerin meme kanserini önlemede önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. Bunlar östrojen reseptörlerine bağlanmak için östrojenlerle yarışacaklardır. Fitoöstrojenler alg ve funguslarda yoktur, ancak diğer bitkilerin tüm kısımlarında mevcuttur. Fitoöstrojen çalışmaları, uygun fitoöstrojenleri içeren hangi meyve ve sebzelerin meme dokusunda östrojen biyosentezini inhibe edeceğini ve meme kanserinin görülme sıklığını azaltmak için menapoz sonrasındaki kadınların beslenmelerinde yer almasının uygun olacağını belirlememize yardım edebilir.

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak, *Sparus aurata*'da aromataz aktivitesini ölçmek için florometrik DBFOD metodunu optimize ettik. Herhangi bir deniz balığı için *Sparus aurata* beyin ve karaciğer aromataz aktivitesi florometrik bir substrat olan dibenzilfloresein kullanılarak ilk kez rapor edilmiştir. Testosteron aromatazın doğal substratı olması nedeniyle deneylerimizde DBFOD aktivitesi üzerine testosteronun etkisini çalıştık. Testosteronun çok düşük konsantrasyonlarda dahi DBFOD aktivitesi üzerine yarışmalı inhibisyon gösterdiğini gördük. Bu sonuç bize aromataz enziminin DBF ile *in vitro* ölçülebilirliğini kanıtlamış olmaktadır. *Sparus aurata* beyin dokusundan total RNA izolasyon metoduyla mRNA elde ettik. PCR sonucunda agaroz jelde bant oluşumu gözlenmedi. RT-PCR metoduyla elde ettiğimiz cDNA'larla rat primelerinin birbirine uymaması bize balık ile rat primerlerinin birbirlerinden ayrı olduğunu göstermiştir. *Sparus aurata* mikrozomal beyin ve karaciğer aromatazının birbirlerinden farklı reaksiyon koşullarına sahip olması aromatazın regülasyonunun doku spesifik promotorlar tarafından yürütüldüğü görüşünü desteklemektedir. Bu deneyin yukarıda tartıştığımız özellikleri göz önünde bulundurularak *Sparus aurata*'nın ticari üretiminde eşeyi kontrol etme aracı olarak pratik sıcaklık uygulaması kullanılabilir olacaktır. Dolayısıyla dişilerin yüksek üreme performansı yüzünden oluşacak kalabalık önlenebilecek, ayrıca eşey kontrol tekniğinde hormonların kullanılmasının hem sağlık hem de ekolojik olarak dezavantajlarını ortadan kaldırabilecektir. Optimize ettiğimiz deneyin koşulları, diğer türlerde de aromataz aktivitesinin ölçülmesine, doku dağılımının saptanmasına ve çevresel kontaminantlardan etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesine bir basamak oluşturacaktır. Tüm yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde ve bu konuda yapılacak daha geniş çalışmalarla balıklardaki üreme fonksiyonunun ve kontrol mekanizmasının anlaşılması mümkün olabilecek ayrıca aromatazın fonksiyonel inhibisyonu ile meme kanserinden korunmada ve tedavide yeni yaklaşımlar ortaya konulabilecektir. Buda ilaç endüstrisinde yeni diyetel ve doğal kaynaklı etkin inhibitörlerin sentezi için önem arz etmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akbay, P., Basaran, A. A., Undeger, U., and Basaran, N. (2003) In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. **Phytother. Res.**, 17: 34-37.
- Amet, Y., Zerilli, A., Goasduff, T., Dreano, Y., and Berthou, F. (1997) Noninvolvement of CYP2E1 in the ( $\omega$ -1)-hydroxylation of fatty acids in rat kidney microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, 54 (8): 947-952.
- Andallu, B., and Varadacharyulu, N. C. (2003) Antioxidant role of mullberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. **Clinica. Chimica. Acta.**, 338: 3-10.
- Andersson, E., Borg, B., and Lambert, J. G. (1988) Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) parr. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 72: 394-401.
- Arinc, E., and Philpot, R.M. (1976) Preparation and Properties of Partialiy Purified Pulmonary Cytochrome P-450 From Rabbits. **J. Biol. Chem.**, 251 (11): 3213-3220.
- Arinc, E., ve Adalı, O. (1983) Alabalık karaciğer mikrozoamlarından kısmen saflaştırılmış iki farklı sitokrom P450'nin hazırlanması ve özellikleri. **Biyokimya Dergisi**, Cilt 8, Sayı 1: 1-27.
- Arinc, E., and Sen, A. (1993) Characterization of cytochrome P450 dependent mixed-function oxidase system of Gilthead seabream (*Sparus aurata*; Sparidae) liver, **Comp. Biochem. Physiol.**, 104B: 133-139.
- Arinc, E., and Sen, A. (1994) In vivo effects of anesthetic benzocaine on liver microsomal cytochrome P450 and mixed-function oxidase activities of Gilthead seabream (*Sparus aurata*), **Comp. Biochem. Physiol.**, 107C: 399-404.
- Assisi, L., Di Fiore, M. M., Lamanna, C., and Botte, V. (2000) Relationships between liver testosterone receptor isoforms and aromatase activity in female green frog, *Rana esculenta*. **Life Sci.**, 67: 373-382.
- Balthazart, J., and Ball, G. (1998) New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). **Trends Neurosci.**, 21: 243-249.
- Baroiller, J. F., Guiguen, Y., and Fostier, A. (1999) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cell Mol. Life Sci.**, 55: 910-931.

- Belcher, S. M., and Zsarnovszky, A. (2001) Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 299: 408–414.
- Benet, L. Z., Kroetz, D. L., Sheiner, L. B. (1996) Biotransformation of drugs, in Hardman, J. G., Limbird, L. L., Molinoff, P. B., et al (eds): Goodman and Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York, McGraw-Hill, 3–28.
- Blázquez, M., Zanuy, S., Carillo, M., and Piferrer, F. (1998) Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **J. Exp. Zool.**, 281: 207–216.
- Blázquez, M., and Piferrer, F. (2004) Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Mol. Cell. Endocrinol.**, 219: 83–94.
- Bolkent, S., Yanardag, R., Karabulut-Bulan, O., and Yesilyaprak, B. (2005) Protective role of *Melisa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study. **J. Ethnopharmacol.**, 99: 391-398.
- Borg, B., Timmers, R. J., and Lambert, J. G. (1987) Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. I. Distribution and effects of season and photoperiod. **Exp. Biol.**, 47: 63–68.
- Brodie, B. B., and Maickel, R. P. (1962) Comparative biochemistry of drug metabolism. In Proceedings of the First International Pharmacological Meeting, 6: 299–324.
- Brodie, A., Lu, Q., and Long, B. (1999) Aromatase and its inhibitors. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 69: 205-210.
- Brodie, A., Inkster, S., and Yue, W. (2001) Aromatase expression in the human male. **Mol. Cell Endocrinol.**, 178: 23-28.
- Buhler, D. R., and Williams, D. E. (1989) Enzymes Involved in Metabolism of PAHs in fishes and Other Aquatic Animals, In U. Varanasi, Metabolism of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. **CRC Press**, New York, pp. 151-184.
- Buzdar, A., and Howell, A. (2001) Advances in aromatase inhibition: clinical efficacy and tolerability in the treatment of breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, 7: 2620-35.
- Callard, G. V., Petro, Z., and Ryan, K. J. (1977) Identification of aromatase in the reptilian brain. **Endocrinology**, 100: 1214–1218.
- Callard, G. V., Petro, Z., and Ryan, K. J., (1978) Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. **Endocrinology**, 103: 2283–2290.

- Camus, P., and Koutsikopoulos, A. (1984) Incubation experimentale et developpement embryonnaire de la daurade royale *Sparus aurata* (L.), a differentes temperatures. **Aquaculture**, 42 : 117-128.
- Candan, F., and Sökmen, A. (2004) Effects of *Rhus corioria* L. (Anacardiaceae) on lipid peroxidation and free radical scavenging acivity. **Phytother. Res.**, 18 : 84-86.
- Capdevila, J. H., and Falck, J. R. (2001) The CYP P450 Arachidonic acid Monooxygenases: From Cell Signaling to Blood Pressure Regulation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 285 (3): 571-576.
- Chang, L. –W., Yen, W. –J., Huang, S. C., and Duh, P. –D. (2002) Antioxidant activity of sesame coat. **Food Chemistry**, 78: 347-354.
- Chardard, D., Desvages, G., Pieau, C. and Dournon, C. (1995) Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltii* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. **Gen Comp. Endocrinol.**, 99: 100–107.
- Chaty, S., Rodius, F., and Vasseur, P. (2004) A Coparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicol.**, 69 (1): 81-93.
- Chervinski, J., and Chanin, Y. (1985) Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) a candidate for culture in ponds- Laboratory experiments. **Bamidgeh**, 37 (2): 42.
- Clint, S., and Zupanc, G. (2001) Neuronal regeneration in the cerebellum of adult teleost fish, *Apteronotus leptorhynchus*: guidance of migrating young cells by radial glia. **Dev. Brain Res.**, 130: 15–23.
- Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D., and Meninchini, F. (2006) Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Lauris nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare subsp. Piperitum* (ucria) coutinho seeds. **Biol. Pharm. Bull.**, 29 (10): 2056-2064.
- Cooke, B., Hegstrom, C. D., Villeneuve, L. S., and Breedlove, S. M. (1998) Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. **Front Neuroendocrinol.**, 19: 323-362.
- Davey, M. W., Bauw, G., and Montagu, M. V. (1996) Analysis of ascorbate in plant tissue by high performance capillary zone electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, 239: 8–19.
- D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., and Baroiller, J. F. (2001) Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Mol. Reprod. Dev.**, 59: 265–276.
- Duthie, G. G. (1999) Parsley, polyphenols and nutritional antioxidants. **British Journal of Nutrition**, 81: 425–426.

- Ey, P. L., and Ashman, L. K (1986) The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin and immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. **Method in Enzimology.**, 121: 497-509.
- Fejes, S. Z., Blazovics, A., Lemberkovics, E., Petri, G., Szoke, E., Kery, A., (2000) Free radical scavenging and membrane protective effects of methanol extracts from *Anthriscus cerefolium* L. (Hoffm.) and *Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. ex. A. W. Hill. **Phytotherapy Research**, 14: 362–365.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., and Araujo, M. E. M. (2006) In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of plants from Portugal. **J. Ethnopharmacol.**, 108: 31-37.
- Folmar, L. C., Denslow, N. D., Kroll, K., Orlando, E. F., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., and Guillette, Jr. L. J. (2001) Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 40: 392–398.
- Forlano, P., Deitcher, D., Myer, D., and Bass, A. (2001) Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. **J. Neurosci.**, 22: 8943–8955.
- Francis, G. W., and Isaksen, M. (1989) Droplet counter current chromatography of the carotenoids of parsley *Petroselinum crispum*. **Chromatographia**, 27: 549–551.
- Freddi, A., Berg, and L., Bilio, M. (1981) Optimal salinity-temperature combinations for the early life stages of Gilthead seabream, *Sparus aurata*. **J. World maric. Society**, 12: 130-136.
- Fukai, T., Marumo, A., Kiatou, K., Kanda, T., Terada, S., and Nomura, T. (2002) Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract. **Life Sciences**, 71: 1149–1163.
- Fukai, T., Satoh, K., Nomura, T., and Sakagami, H. (2003) Antinephritis and radical scavenging activity of prenylflavonoids. **Fitoterapia**, 74: 720–724.
- Gebhardt, R. (1997) Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. **Toxicol. Applied Pharmacol.**, 144: 279-286.
- Gelinas, D., and Callard, G. V. (1993) Immunocytochemical and biochemical evidence for aromatase in neurons of the retina, optic tectum and retinotectal pathways in goldfish. **J. Neuroendocrinol.**, 5: 635–641.
- Gelinas, D., and Callard, G. V. (1997) Immunolocalization of aromatase- and androgen receptor-positive neurons in the goldfish brain. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 106: 155–168.

- Gelinas, D., Pitoc, G. A., and Callard, G. V. (1998) Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. **Mol. Cell. Endocrinol.**, 138: 81–93.
- Gonzalez, F. J. (1992) Control of constitutively-expressed developmentally- activated rat hepatic cytochrome P450 genes. **Keio J. Med.**, 41: 68–75.
- González, A., and Piferrer, F., (2002) Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. **J. Exp. Zool.**, 293: 500–510.
- González, A., and Piferrer, P. (2003) Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 132: 223–230.
- Gonzalez, F. J., Yu, A.-M. (2006) Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 46: 41-64.
- Goto-Kazeto, R., Kight, K., Zohar, Y., Place, A., and Trant, J. M. (2004) Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebra fish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 139: 72–84.
- Graddy, L., Kowalski, A., Simmen, F., Davis, S., Baumgartner, W. and Simmen, R. (2000) Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 73: 49–57.
- Gronen, S., Denslow, N., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D., and Brouwer, M. (1999) Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. **Environ. Health Perspect.**, 107: 385–390.
- Guiguen, Y., Baroiller, J., Ricordel, M., Iseki, K., McMeel, O. M., Martin, S. A. M., and Fostier, A. (1999) Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Mol. Reprod. Dev.**, 54: 154–162.
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chem. Biol. Interact.**, 139: 1–21.
- Hollman, P.C., Katan, M.B. (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed. Pharmacother.**, 51: 305–310.
- Hong, N., Yaylayan, V. A., Raghavan, G. S., Pare, J. R., and Belanger, J. M. (2001) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed. **Nat. Prod Lett.**, 15 (3): 197-204.
- Ito, M., Ishikawa, M., Suzuki, S., Takamatsu, N., and Shiba, T. (1995) A rainbow trout SRY-type gene expressed in pituitary glands. **F. E. B. S. Lett.**, 377: 37–40.

- James, V. H., McNeill, J. M., Lai, L. C., Newton, C. J., Ghilchik, M. W., and Reed, M. J. (1987) Aromatase activity in normal breast and breast tumor tissues: in vivo and in vitro studies. **Steroids**, 50: 269–279.
- James, M. O., Lou, Z., Rowland-Faux, L., and Celander, M. C. (2005) Properties and Regional Expression of a CYP3A-Like Protein in Channel Catfish Intestine. **Aquatic Toxicol.**, 72 (4): 361-371.
- Jeyasuria, P., and Place, A. R. (1998) Embryonic brain–gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). **J. Exp. Zool.**, 281: 428–449.
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., and Milos, M. (2007) In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytother. Res.**, 21: 259-261.
- Kao, Y.C., Zhou, C., Sherman, M., Laughton, C.A., and Chen, S. (1998) Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study. **Environ. Health Perspect.**, 106: 85–92.
- Katagiri, M., Tatsuta, K., Imaoka, S., Funae, Y., Honma, K., Matsuo, N., Yokoi, H., Ishimura, K., Ishibashi, F., and Kagawa, N. (1998) Evidence that immature rat liver is capable of participating in steroidogenesis by expressing 17  $\alpha$  -hydroxylase/17,20-lyase P450c17. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 64: 121–128.
- Kim, H., Jeong, T., Lee, M., Park, Y., and Choi, M. (2003) Lipid lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. **Clinica Chimica Acta**, 327: 129–137.
- Kishida, M., and Callard, G. V. (2001) Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. **Endocrinology**, 142: 740–750.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., and Abe, S. I. (1999) Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **J. Mol. Endocrinol.**, 23: 167–176.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., and Abe, S. I. (2000) Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Mol. Reprod. Dev.**, 56: 1–5.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M., Sunobe, T., Morrey, C. E., Suzuki, N., and Nagahama, Y. (2004) Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. **Zool. Sci.** 21: 417–425.



- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature**, 351: 117–121.
- Kuhl, A. J., Manning, S., and Brouwer, M. (2005) Brain aromatase in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Molecular characterization and role in xenoestrogen-induced sex reversal. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 96: 67–77.
- Kwon, J. Y., Haghpanah, V., Kogson-Hurtado, L. M., McAndrew, B. J., and Penman, D. J. (2000) Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. **J. Exp. Zool.**, 287: 46–53.
- Kwon, J. Y., McAndrew, B. J., and Penman, D. J. (2001) Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Mol. Reprod. Dev.**, 59: 359–370.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, 227: 680-684.
- Liska, D. J. (1998) The detoxification enzyme systems. **Altern. Med. Rev.**, 3(3): 187-198.
- Lombardi, G., Zarrilli, S., Colao, A., Paesano, L., Di Somma, C., Rossi, F., and De Rosa, M. (2001) Estrogens and health in males. **Mol. Cell Endocrinol.**, 178: 51-55.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randal, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275.
- Lu, A. Y. H., and Lewin, W. (1974) The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system. **Biochem. Biophys. Acta**, 344: 205-240.
- Luckenbach, J. A., Early, L. W., Rowe, A. H., Boski, R. J., Daniels, H. V., and Godwin, J. (2005) Aromatase cytochrome P450: Cloning, intron variation, and ontogeny of gene expression in Southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). **J. Exp. Zool.**, 303A: 643-656.
- Magnusson, M. O., and Sandström, R. (2004) Quantitative analysis of eight testosterone metabolites using column switching and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 18 (10): 1089-1094.
- Majer, U. H., Gundlach, H., and Zenk, M. H. (1998) Seven imidazole alkaloids from *Lepidium sativum*. **Phytochemistry**, 49 (6): 1791-1795.
- Maksimovic, Z., Malencic, D., Kovacevic, N. (2005) Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigms extracts. **Bioresource Technology**, 96: 873–877.

- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., and Ahern, K. G. (2000) Biochemistry (3rd edition). **Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc**, San Francisco, CA 94025, 1200s.
- Mayer, I., Borg, B., Berglund, I., and Lambert, J. G. D. (1991) Effects of castration and androgen treatment on aromatase activity in the brain of mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 82: 86–92.
- McEwen B. S. (1994) Steroid hormone effects on brain: novel insights connecting cellular and molecular features of brain cells to behavior. **Methods Neurosci.** 22: 525–542.
- McGiff, J. C., and Quilley, J. (1999) 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. **Am. J. Physiol.** 277: R607–R623.
- Means, G. D., Kilgore, M. W., Mahendroo, M. S., Mendelson, C. R., and Simpson, E. R. (1991) Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. **Mol. Endocrinol.**, 5: 2005-2013.
- Melo, A. C., Edmunds, J. S., and Ramsdell, J. S. (1999) Localization and sex steroid regulation of brain aromatase activity: identification of a positive feedback mechanism that may trigger environmental cues. In: Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment, Vol. 8., (Henshel, D. S., Black, M. C., Harrass, M. C., Eds). **PA: American Society for Testing and Materials**, West Conshohocken, 226–238.
- Melo, A. C., and Ramsdell, J. S. (2001) Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. **Environ. Health Persp.**, 109: 257–264.
- Menuet, M., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., and Kah, O. (2003) Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: comparison with estrogen receptor. **J. Comp. Neurol.**, 462: 180–193.
- Milano, E. G., Basari, F., and Chimenti, C. (1997) Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. **Gen Comp. Endocrinol.**, 108: 483–496.
- Moon, Y. J., Wang, X., and Morris, M. E. (2006) Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol. in vitro.**, 20:187-210.
- Morcillo, Y., Albalat, A., and Porte, C. (1999) Mussels as sentinels of organotin pollution: bioaccumulation and effects on P450-mediated aromatase activity. **Environ. Toxicol. Chem.** 18 (6): 1203–1208.
- Naftolin, F., Ryan, K. J., Davies, I. J., Reddy, V. V., Flores, F., Petro, Z., Kuhn, M., White, R. J., Takaoka, Y., Wolin, L. (1975) The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. **Rec. Progr. Horm. Res.**, 31: 295–319.

- Nebert, D. W., and Gonzalez, F. J. (1987) P-450 Genes: structure, evolution and regulation. **Ann. Rev. Biochem.**, 56: 945-993.
- Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I. R., Sato, R., and Waterman, M. R. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. **DNA**, 6: 1-13.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., and Nebert, D. W. (1996) P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, 6: 1-42.
- Nelson, D. R. (2003) Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. **Arch. Biochem. Biophys.**, 409(1): 18-24.
- Noaksson, E., Tjarnlund, U., Bosveld, A.T., Balk, L. (2001) Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish Lake in the vicinity of a public refuse dump. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 174: 160–176.
- Oleksiak, M. F., Wu, S., Parker, C., Karchner, S. L, Stegeman, J. J., and Zeldin, D. C. (2000) Identification, functional characterization, and regulation of a new cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ns. **J. Biol. Chem.**, 275 (4): 2312-2321.
- Oleksiak, M. F., Wu, S., Parker, Qu, W., Cox, R., Zeldin, D. C., and Stegeman, J. J. (2002) Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. **Arch. Biochem. Biophys.**, 411 (2): 223-234.
- Ozsoy-Sacan, O., Karabulut-Bulan, O., Bolkent, S., Yanardag, R., and Ozgey, Y. (2004) Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var cicla) on the liver of the diabetic rats: A morphological and biochemical study. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 68 (8): 1640-1648.
- Ozsoy-Sacan, O., Yanardag, R., Orak, H., Ozgey, Y., Yarat, A., and Tunali, T. (2006) Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornuride on the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, 104: 175-181.
- Pasmanik, M., and Callard, G. V. (1985) Aromatase and 5 $\alpha$ -reductase in the teleost brain, spinal cord and pituitary gland. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 60: 244–251.
- Pasmanik M., Callard G. V., (1988) Changes in brain aromatase and 5 $\alpha$ -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). **Endocrinology**, 122: 1349–1356.
- Pavlidis, M., Koumoundouros, G., Steriotti, A., Somarakis, S., Divanach, P., and Kentouri, M. (2000). Evidence of temperature dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **J. Exp. Zool.**, 287: 225–232.
- Porter, T. D., and Coon M. J. (1991) Cytochrome P450, Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. **J. Biol. Chem.**, 266(21): 13469-13472.

- Price, T., Aitken, J., and Simpson, E. R. (1992) Relative expression of aromatase cytochrome P450 in human fetal tissues as determined by competitive polymerase chain reaction amplification. **J. Clin. Endocr. Metab.**, 74: 879–883.
- Roselli, C. E., Horton, L. E., and Resko, J. A. (1985) Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. **Endocrinology**, 117: 2471–2477.
- Ross, J. A., Kasum, C. M. (2002) Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety. **Ann. Rev. Nutr.**, 22: 19-34.
- Ryan, K. J. (1959) Biological aromatization of steroids. **J. Biol. Chem.**, 234: 268-272.
- Samarth, R. M., Panwar, M., Kumar, M., and Kumar, A. (2006) Protective effects of *Mentha piperita* Linn on benzo [a] pyrene-induced lung carcinogenicity and mutagenicity in Swiss albino mice. **Mutagenesis**, 21 (1): 61–66.
- Samman, M. A., Bowen, I. D., Taiba, K., Antonius, J., and Hannan, M. A. (1998) Mint prevents shamma-induced carcinogenesis in hamster cheek pouch. **Carcinogenesis**, 19: 1795–1801.
- Santen, R. J., and Harvey, H. A. (1999) Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. **Endocr. Relat Cancer**, 6: 75–92.
- Sasaki, K., Wada, K., Tanaka, Y., Yoshimura, T., Matuoka, K., and Anno, T. (2005) Thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in Mouse liver. **J. Food**, 8 (2): 184–189.
- Schenkman, J. B., and Cinti, D. L. (1978) Preparation of microsomes with calcium. **Methods in Enzimology**, 52: 83-89.
- Schenkman, J. B. (1991) Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase: An Overview, In molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds, (Arinc, E., Schenkman, J. B. and Hodgson, E., Eds.), **Plenum Press**, NewYork, pp. 1-10.
- Schumacher, M., and Balthazart, J. (1987) Neuroanatomical distribution of testosterone-metabolizing enzymes in the Japanese quail. **Brain Res.**, 422: 137–148.
- Semenza, J. C., Tolber, P. E., Rubin, C. H., Guillette, L. J., and Jackson, R. J. (1997) Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. **Environ. Health Perspect.**, 105: 1030–1032.
- Silverin, B., Baillien, M., Foidart, A., and Balthazart, J. (2000) Distribution of aromatase activity in the brain and peripheral tissues of passerine and nonpasserine avian species. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 117: 34–53.
- Simic, M., Kundakovic, T., and Kovacevic, N. (2003) Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. **Fitoterapia**, 74: 613–616.

- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Corbin, C. J., and Mendelson, C. R. (1993) Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 44: 321-330.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D., et al., (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocr. Rev.**, 15: 342-355.
- Simpson, E. R., Michael, M. D., Agarwal, V. R., Hinshelwood, M. M., Bulun, S. E., and Zhao, A. Y. (1997) Expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. **FASEB J.**, 11: 29-36.
- Simpson, E. R., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Davis, S., and Jones, M. (1999) Local estrogen biosynthesis in males and females. **Endocrine-Related Cancer**, 6: 131-137.
- Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Jones, M., and Davis, S. (2000) The role of local estrogen biosynthesis in males and females. **Trends Endocrinol. Metab.**, 11: 184-188.
- Solum, D. T., and Handa, R. J. (2002) Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. **J. Neurosci.**, 22: 2650-2659.
- Steckelbroeck, S., Heidrich, D. D., Stoffel-Wagner, B., Hans, V. H. J., Schramm, J., Bidlingmaier, F., and Klingmüller, D. (1999) Characterization of aromatase cytochrome P450 activity in the human temporal lobe. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 84 (8): 2795-2801.
- Strobl-Mazzulla, P. H., Moncaut, N. P., López, G. C., Miranda, L. A., Canario, A. V. M., and Somoza, G. M. (2005) Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 143: 21-32.
- Stuermer, C. A, Bastmeyer, M., Bahr, M., Strobel, G., Paschke, K. (1992) Trying to understand axonal regeneration in the CNS of fish. **J. Neurobiol.** 23: 537-550.
- Szotakova, B., Baliharova, V., Lamka, J., Nozinova, E., Wsol, V., Velik, J., Machala, M., Neca, J., Soucele, P., Susova, S., and Skalova, L. (2004) Comparison of *in vitro* activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. **Research in Veterinary Science**, 76 (1): 43-51.
- Şen, A., and Arınç, E. (1998) Purification and characterization of cytochrome p450 reductase from leaping mullet (*Liza saliens*) liver microsomes. **Journal of Biochem. and Mol. Toxicol.**, 12: 103-113.
- Tandler, A., and Helps, S. (1985) The effect of photoperiod and water exchange rate on growth and survival of Gilthead seabream (*Sparus aurata*) from hatching to metamorphosis in mass rearing system. **Aquaculture**, 48: 71-82.

- Teuber, H., and Herrmann, K. (1978) Flavonol glycosides of leaves and fruits of dill (*Anethum graveolens* L.). II. Phenolics of spices (author's transl.). **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, 167 (2): 101-104.
- Tekmal, R. R., Ramachandra, N., Gubba, S., Durgam, V. R., Mantione, J., Toda, K., Shizuta, Y., and Dillehay, D. L. (1996) Overexpression of int-5/aromatase in mammary glands of transgenic mice results in the induction of hyperplasia and nuclear abnormalities. **Cancer Res.** 56: 3180–3185.
- Tchoudakova, A., and Callard, G. V. (1998) Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isoenzymes in brain and ovary. **Endocrinology**, 139: 2179–2189.
- Thompson, Jr. E. A., and Siiteri, P. K. (1974) The involvement of human placental microsomal cytochrome P450 in aromatization. **J. Biol. Chem.**, 249: 5373–5378.
- Timmers, R. J. M., Lambert, J. G. D., Peute, J., Vullings, H. G. B., and VanOordt, P. G. W. J. (1987) Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. **Comp. Neurol.**, 258: 368–377.
- Tong, S.-K., Chiang, E. F., Hsiao, P.-H., and Chung, B. (2001) Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 79: 299–303.
- Vockel, A., Prove, E., and Balthazart, J. (1990) Sex- and age-related differences in the activity of testosterone-metabolizing enzymes in microdissected nuclei of the Zebra finch brain. **Brain Res.**, 511: 291–302.
- Wang, C., Makela, T., Hase, T., Adlercreutz, H., and Kurzer, M.S. (1994) Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, 50: 205–212.
- WEB\_1. (29.09.2006). <http://drnelson.utm.edu/famcount.html> (28.05.2007).
- WEB\_2. (06.05.2007).  
<http://www.ziraatci.com/yetistir/sayfa.asp?konuid=177&manual=off&shf=1>  
(06.05.2007).
- WEB\_3.  
[http://www.bdbiosciences.com/discovery\\_labware/gentest/products/pdf/crs\\_inhibition.pdf](http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/gentest/products/pdf/crs_inhibition.pdf) (27.01.07).
- Weigel, N. L., and Rowan, B. G. (2001) Estrogen and Progesterone Action. In L. J. DeGroot, J. L. Jameson, H. G. Burger, D. L. Loriaux, J. C. Marshall, S. Melmed, W. D. Odell, J. T. Jr. Potts, and A. H. Rubenstein (eds.), **Endocrinology**, Fourth Edition, Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 2053–2060.
- Werck-Reichhart, D., and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. **Genome Biology**, 1 (6).

- White, R. S., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., and Parker, M. G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. **Endocrinology**, 135: 175–182.
- Williams, C., and Stancel, G. M. (1996) Estrogens and Progestins. *In* J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, and A. G. Gilman (eds.), Goodman and Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Ninth Edition, New York: McGraw-Hill, pp. 1411–1440.
- Williams, C. L. (1998) Estrogen effects on cognition across the lifespan. **Horm. Behav.**, 34: 80–84.
- Yamamoto, T. (1969) Sex differentiation, in fish physiology, vol. 3., (Hoar, W. S., Randall, D. J. and Donaldson, E. M., Eds.), **Academic Press.**, New York, s117–175.
- Yu, D., Duan, Y., Bao, Y., Wei, C., and An, L. (2005) Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by l-glutamate. **J. Ethnopharmacol.**, 98: 89–94.
- Zhao, J., Mak, P., Tchoudakova, A., Callard, G., and Chen, S. (2001) Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes. **Gen Comp. Endocrinol.**, 123: 180–191.
- Zimniak, P., and Waxman, D. J. (1993) Liver Cytochrome P450 Metabolism of endogenous steroid hormones, bile acids, and fatty acids. *In* Handbook of Experimental Pharmacology (Schenkman, J. B., and Greim, H., Eds.), **Springer-Verlag Pres**, Heidelberg, Vol. 105, pp. 123–144.

## ÖZGEÇMİŞ

**SOYADI** HANÇER  
**ADI** Demet  
**DOĞUM TARİHİ** 05 Ekim 1982  
**ADRESİ** Siteler m. Bursa c.  
6243 s. No:2/3  
Kınıklı/Denizli  
**TEL** +90-539-503-3750  
**FAX** -  
**EMAİL** [hancerdemet@yahoo.com.tr](mailto:hancerdemet@yahoo.com.tr)

## EĞİTİM DURUMU

2004- Yüksek Lisans: Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü  
Pamukkale Üniversitesi (PAÜ)  
Denizli, Türkiye  
2000–2004 Lisans: Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü  
Pamukkale Üniversitesi (PAÜ)  
Denizli, Türkiye

## KONFERANS BİLDİRİLERİ:

Hancer, D., and A. Sen, Characterization of brain Dibenzylfluorescein *O*-Dibenzylase in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata* L., 1758), 32nd FEBS Congress, Vienna, Austria , 7-7-12 July 2007.